

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

Scuola di Dottorato in Scienze Mediche e Chirurgiche Cliniche

Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche Umane e
Molecolari

Settore Disciplinare BIO/16

Dipartimento di Scienze Anatomiche Umane e
Fisiopatologia dell'Apparato Locomotore

GLI ALCHILFOSFOLIPIDI COME FARMACI INNOVATIVI DEL TRATTAMENTO DELLE LEUCEMIE ACUTE

Tesi di Dottorato

Tutore:
CHIAR.MO PROF. A.M. MARTELLI

PAPA

Presentata da:
DOTT.SSA VERONICA

Coordinatore
CHIAR.MO PROF. LUCIO COCCO

XXI Ciclo

Anno Accademico 2007/2008

INDICE	3
I INTRODUZIONE	8
1. La via di segnalazione fosfoinositide 3-chinasi/Akt	8
1.1 La famiglia delle fosfoinositide 3-chinasi (PI3K)	8
1.1.1 PI3K di classe I	8
1.1.2 Attivazione delle PI3K di classe IA	9
1.2 La serina/treonina chinasi Akt	13
1.2.1 Il meccanismo d'attivazione di Akt.	13
1.3 La regolazione negativa della via di segnalazione PI3K/Akt	14
1.4 Effetti biologici dell'attivazione di Akt	19
1.4.1 Bersagli anti-apoptotici della via PI3K/Akt	19
1.4.2 Il <i>pathway</i> PI3K/Akt e la regolazione del ciclo cellulare	20
1.4.3 Il <i>pathway</i> PI3K/Akt e il metabolismo cellulare	21
1.5 La via di segnalazione delle MAP chinasi nelle malattie ematologiche	22
1.6 La via di segnalazione PI3K/Akt nelle leucemie umane	26
1.6.1 L'inibizione dell'asse PI3K/Akt come terapia delle leucemie	28
1.6.1.1 Inibitori di PI3K	28
1.6.1.2 Inibitori di Akt	29

1.7 La perifosina	29
1.7.1 Meccanismo d'azione	30
1.7.2 Farmacocinetica	32
1.7.3 Studi <i>in vitro</i>	33
1.7.4 Studi clinici	34
1.7.4.1 <i>Trials</i> di FASE I	34
1.7.4.2 <i>Trials</i> di FASE II	35
1.8 L'Erufosina, una nuova alchilfosfocolina nella cura della leucemia mieloide acuta	36
II. SCOPO DELLA RICERCA	41
III MATERIALI	43
IV METODI	45
4.1. Colture cellulari	45
4.2. Saggio MTT	45
4.3. Analisi degli effetti procurati dall'uso combinato di farmaci	46
4.4. Risultati Statistici	47
4.5. Analisi del ciclo cellulare in cellule THP-1	48
4.6. Determinazione dell'apoptosi cellulare	48

4.7. Preparazione dei lisati cellulari	49
4.8. Western blotting	51
4.9 Immunoprecipitazione dei complessi m TORC	53
4.10 Saggio citofluorimetrico per la determinazione dell'attività delle caspasi (<i>FLICA assay</i>)	53
4.11 Fenotipizzazione citofluorimetrica di cellule THP-1 trattate con perifosina	54
4.12 Saggio clonogenico di cellule AML	55
4.13 <i>Reverse transcriptase</i> - PCR	56
V RISULTATI	57
5.1.1 La perifosina induce apoptosi e arresto del ciclo cellulare in cellule di leucemia mieloide acuta	57
5.1.2 La perifosina causa la diminuzione dei livelli di fosforilazione di p-Akt e p-Erk1/2 e comporta l'attivazione delle caspasi e il taglio proteolitico di PARP	62
5.1.3 In cellule THP-1, il trattamento con perifosina non ha effetto sui livelli di espressione di PDK-1 e sul complesso m TORC1/m TORC2	65
5.1.4 La perifosina causa, in cellule THP-1 la defosforilazione di Bad	66
5.1.5 L'apoptosi indotta da perifosina è mediata, in cellule THP-1, da Fas, Fas-L e da JNK	69

5.1.6 La perifosina modifica i livelli di espressione di p-Akt, ma non di p-FLT3 in cellule di leucemia mieloide MV4-11	72
5.1.7 Il trattamento con perifosina regola negativamente la sopravvivenza cellulare di blasti di pazienti affetti da AML	75
5.1.8 Effetti della perifosina sulla capacità clonogenica di cellule CD34 ⁺ isolate da pazienti affetti da AML e da donatori sani	81
5.2.1 L'ErPC3 influenza negativamente la sopravvivenza cellulare e induce apoptosi e blocco del ciclo cellulare in linee cellulari di AML	83
5.2.2 Il trattamento con ErPC3 modula i <i>pathways</i> di trasduzione del segnale di PI3K/Akt e di MEK/Erk nella linea THP-1	87
5.2.3 L'apoptosi indotta da ErPC3 è in cellule THP-1 caspasi-dipendente	88
5.2.4 Il trattamento con ErPC3 determina un'attivazione temporanea e transiente di p-JNK 2/3 in cellule THP-1	89
5.2.5 Induzione sinergica di citotossicità attraverso trattamenti combinati di ErPC3 con etoposide, doxorubicina e mitoxantrone	92
VI DISCUSSIONE	94
6.1 La perifosina, un nuovo inibitore di Akt, induce arresto del ciclo cellulare, e apoptosi in cellule di leucemia mieloide acuta con un meccanismo JNK dipendente	94
6.2 L'ErPC3 induce arresto del ciclo cellulare, apoptosi e sinergizza con agenti chemioterapici convenzionali in cellule di leucemia mieloide acuta	97
VII BIBLIOGRAFIA	101

I INTRODUZIONE

1. La via di segnalazione fosfoinositide 3-chinasi/Akt

La serina/treonina chinasi Akt svolge ruoli regolatori cruciali in differenti processi fisiologici quali, il differenziamento cellulare, il ciclo cellulare, la trascrizione, la traduzione, il metabolismo e l'apoptosi.

L'attivazione di Akt dipende direttamente da quella di un'altra chinasi, la fosfoinositide 3-chinasi (PI3K), di cui Akt è un bersaglio a valle. Questa chinasi, attraverso la produzione di secondi messaggeri lipidici è in grado di attivare Akt, dando vita alla via di segnalazione PI3K/Akt. [Franke, Yang et al., 1995]. Vista l'importanza di Akt nel controllo sia della proliferazione che della sopravvivenza cellulare, le alterazioni nella via di segnalazione PI3K/Akt costituiscono un punto chiave nell'insorgenza e nella progressione di molte neoplasie tra cui la leucemia mieloide acuta (AML) [Dudek H, 1997; Hanada M, 2004; Altomare DA 2005; Martelli AM, 2005]. Sono numerosi, infatti, i tumori umani che presentano mutazioni e riarrangiamenti cromosomici a livello di questo *pathway*.

1.1 La famiglia delle fosfoinositide 3-chinasi (PI3K)

Le fosfoinositide 3-chinasi sono proteine eterodimeriche costituite da una subunità catalitica e da una regolatoria. Sono distinte in tre classi di PI3K (classe I, II e III) in base ai domini proteici che le costituiscono e ne determinano la specificità. (Fig. 1.1); di queste la classe I è quella meglio caratterizzata e comprende una serie di elementi chiave per l'integrazione di diversi segnali cellulari.

1.1.1 PI3K di classe I

Le PI3K di classe I catalizzano il trasferimento di un gruppo γ -fosforico dell' ATP sulla posizione D₃ del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂) producendo così fosfatidilinositolo-3,4,5 trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃) il quale a sua volta funge da ligando per reclutare, sulla faccia interna della membrana cellulare, proteine contenenti domini Pleckstrin Homology (PH) tra cui Akt. [Vivanco I 2002; Martelli AM, 2006]

La classe I viene ulteriormente suddivisa in due sottoclassi, IA e IB.

Classe IA: le PI3K di classe IA vengono attivate da recettori ad attività tirosina-chinasica e sono composte da una subunità catalitica del peso di 110 kDa (p110), e da una subunità regolatoria del peso di 85KDa.

La subunità p110 è codificata da tre differenti geni (p110 α , p110 β , p110 δ) e contiene diversi domini: un dominio per il legame della subunità regolatrice p85, un dominio RAS-binding (RBD), un dominio C2 (protein-kinase-C homology-2), un dominio a elica e uno catalitico.

Della subunità regolatrice p85 esistono, inoltre, diverse varianti generate da fenomeni di *splicing* alternativi a partire dai prodotti di tre geni. Tutte possiedono due domini SH2 (Rous-sarcoma-oncoprotein homology-2) separati da un dominio per l'interazione con p110 (Fig. 1.1).

Classe IB: Queste PI3K sono costituite dalla subunità catalitica p110 γ associata ad una subunità regolatrice di 101 kDa (p101) (Fig. 1.1) e vengono attivate da recettori di membrana associati a proteine G eterotrimeriche.

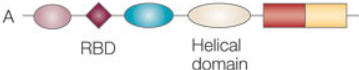

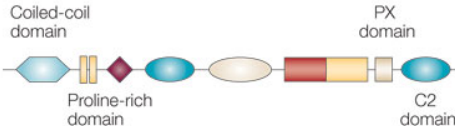

1.1.2 Attivazione delle PI3K di classe IA

Il meccanismo che porta all'attivazione delle PI3K di classe IA (Fig. 1.2) prevede che in condizioni di riposo il complesso p85-p110 sia presente in forma inattiva all'interno del citoplasma e che, in seguito a stimolazione delle RTK da parte di specifici ligandi, i recettori dimerizzino e si fosforilino in *trans* sui residui di tirosina presenti a livello delle loro porzioni citoplasmatiche.

La dimerizzazione del recettore e la sua attivazione per fosforilazione permettono, quindi, il reclutamento alla membrana plasmatica del complesso p85-p110 della PI3K tramite interazione dei domini SH2 di p85 con i residui di fosfo-tirosina della RTK.

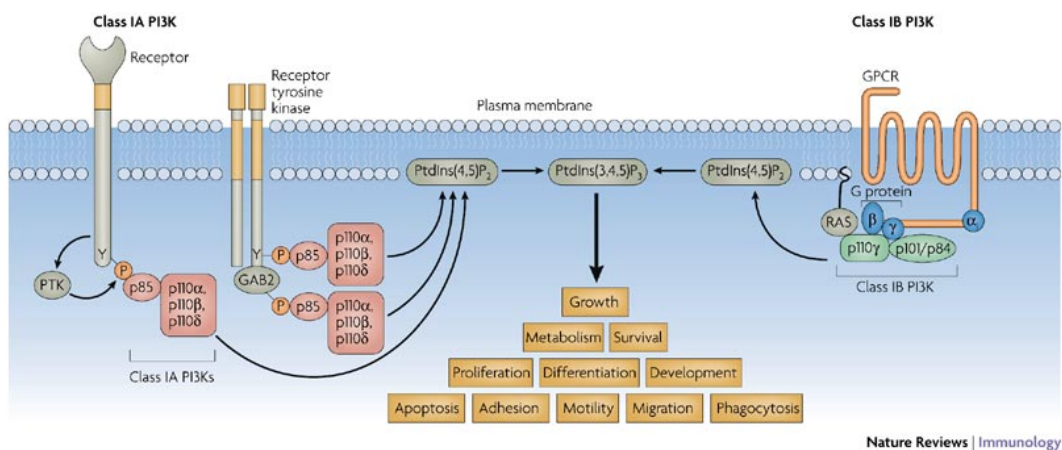
Il legame della subunità regolatoria p85 al recettore determina, a sua volta variazioni conformazionali della PI3K che, a livello della subunità catalitica, giunge in prossimità del suo substrato lipidico [Vivanco I 2002].

Evidenze scientifiche dimostrano che p110 può essere attivata anche in maniera indiretta attraverso l'intervento di Ras o di molecole adattatrici, tra cui GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2). Questa proteina è in grado, infatti, di legare le tirosine fosforilate di RTK e reclutare a sua volta la famiglia di molecole adattatrici GAB (GRB2-associated binding proteins) che legano p85. [Cully M, 2006; Rodriguez-Viciano P, 1994; Chan TO, 2002]. (Fig. 1.2)

		Subunits			
Class	Structural features of catalytic subunits	Catalytic	Adaptor	Regulation	Lipid substrate specificity
I	 <p>Adaptor-binding domain C2 domain Catalytic domain RBD Helical domain</p>	p110 α,β,δ	p85 α p55 α p50 α p85 β p55 γ	Receptor tyrosine kinases and RAS (p110 β is also regulated by G-protein-coupled receptors)	PIP ₂ PIP PI
	 <p>B</p>	p110 γ	p101 p84	G-protein-coupled receptors and RAS	PIP ₂ PIP PI
II	 <p>Coiled-coil domain Proline-rich domain PX domain C2 domain</p>	PI3K-C2 α,β,γ	?	Receptor tyrosine kinases? G-protein-coupled receptors?	PIP ₂ PI
III		Vps34p analogues	p150	Constitutive?	PI

Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Fig. 1.1 Classificazione delle isoforme di PI3K. Le chinasi di tutte e tre le classi vengono ampiamente espresse nell'intero organismo, ad eccezione della classe IA con subunità catalitica p110 δ , presente prevalentemente nei linfociti.



Nature Reviews | Immunology

Fig. 1.2 Modello del meccanismo di attivazione della PI3K di classe IA.

1.2 La serina/treonina chinasi Akt

Akt (anche nota come proteina chinasi B (PKB)) è una serina/treonina chinasi del peso di 57KDa che nei mammiferi rappresenta l'omologo dell'oncogene virale v-Akt responsabile del linfoma delle cellule T murine [Franke TF, 2003]. Attualmente se ne riconoscono tre isoforme (Akt1/ α , 2/ β e 3/ γ), tutte strettamente correlate tra loro e con un elevato grado di conservazione [Martelli AM 2005; Martelli AM 2006]. Akt1 è ubiquitariamente espressa ad alti livelli ad eccezione di rene, milza e fegato; Akt2 è presente in tutti gli organi con livelli di espressione differenti (molto abbondante nei muscoli scheletrici, nell'intestino e nei tessuti riproduttivi); Akt3 manca in numerosi tessuti in cui sono presenti le altre due isoforme, ma mostra livelli d'espressione relativamente elevati a livello del cervello e dei testicoli.

Le isoforme di Akt possiedono tutte la stessa organizzazione strutturale in cui il dominio catalitico è localizzato nella parte centrale della proteina, mentre nelle regioni C- ed N-terminali sono presenti rispettivamente un dominio regolatorio e un dominio PH (Fig. 1.3).

1.2.1 Il meccanismo d'attivazione di Akt.

Akt viene attivata attraverso una doppia fosforilazione; dal momento, però, che normalmente, nella sua forma inattiva Akt è localizzata a livello citoplasmatico, il primo passo necessario alla sua attivazione comporta il reclutamento della proteina alla membrana cellulare.

Tramite il suo dominio PH, presente all'estremità N-terminale della molecola, Akt è in grado di legarsi a molecole di PtdIns(3,4,5)P3 (e in minor misura di PtdIns(3,4)P2), a loro volta prodotte dalle PI3K e presenti a livello della membrana plasmatica.

Il reclutamento di Akt alla membrana cellulare provoca una variazione conformazionale della molecola che consente al suo residuo Thr308 di venire fosforilato da PDK1, una serina/treonina chinasi contenente un dominio PH (Fig. 1.4). Questa fosforilazione è, tuttavia, necessaria ma non sufficiente alla completa attivazione di Akt, che necessita pertanto, di una seconda fosforilazione per completare la sua attivazione.

Questa fosforilazione, avviene sul residuo di Serina posto in posizione 473 a livello della estremità C-terminale. [Vivanco I 2002; Martelli AM, 2006].

Per diverso tempo l'identità della chinasi responsabile di questa seconda fosforilazione è rimasta sconosciuta, ma attualmente viene identificata con il complesso mTOR (mammalian target of rapamycin)/Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) (sezione 1.4.2). Tuttavia, non si esclude che ulteriori chinasi possano mediare questa fosforilazione. Altri possibili candidati sono, ad esempio, chinasi integrina-like (ILK), isoforme di PKC e chinasi DNA-dipendenti (Fig. 1.4). Inoltre, sono state osservate altre fosforilazioni che potrebbero aumentare ulteriormente l'attività di Akt ma la cui esatta funzione rimane ancora da chiarire; queste comprendono la fosforilazione di diverse tirosine e della Ser129 ad opera della Caseina chinasi 2 (CK2) [Brazil DP, 2004].

Una volta fosforilata, Akt migra sia all'interno del nucleo sia nel citoplasma, con una prevalenza in questo secondo compartimento cellulare dal momento che la maggior parte dei suoi *targets* hanno una localizzazione citosolica. Tuttavia, i singoli contributi delle varie localizzazioni nel trasmettere il segnale rimangono da definire.

L'attività di Akt viene controllata da un complesso sistema di proteine regolatrici in grado d'interagire con il suo dominio PH, chinamico o

C-terminale [Du K, 2005]. Un esempio è la *heat-shock protein-90* (HSP90), un *chaperon* molecolare che assieme al *co-chaperon* Cdc37 dà vita ad un complesso che lega il dominio chinamico di Akt. Esistono, inoltre, una serie di stress cellulari che determinano l'aumento dell'attività di Akt quali lo *shock* termico, l'ipossia, lo stress ossidativo, l'ipoglicemia e la luce ultravioletta [West KA, 2002]. Questo fenomeno d'iperattivazione stress-indotto risulta di particolare interesse alla luce del fatto che viene messo in atto dalle cellule come meccanismo compensativo per evitare la morte.

1.3 La regolazione negativa della via di segnalazione PI3K/Akt

La via principale attraverso cui l'asse PI3K/Akt viene inattivato è la defosforilazione dei prodotti delle PI3K che fungono da secondi messaggeri per l'attivazione di Akt.

Le molecole di PtdIns(3,4,5)P3 non sono, infatti, substrato di nessuna delle fosfolipasi C conosciute, ma sono invece defosforilati dalle fosfatasi PTEN (Phosphatase and TENsin homologue deleted on chromosome 10) e SHIP (SH domain-containing Inositol Phosphatases). La prima è una fosfatasi dotata di doppia specificità in quanto è in grado di defosforilare sia proteine che lipidi ed è in grado di

rimuovere il gruppo fosfato in posizione 3. (Fig. 1.4) [Maehama T, 1998; Stambolic V, 1998].

SHIP1 e SHIP2, defosforilano il PtdIns(3,4,5)P3 rimuovendo il gruppo fosfato in posizione 5. [Choi Y, 2002].

Negli ultimi anni diversi studi hanno mostrato come il *pathway* PI3K/Akt sia regolato anche mediante defosforilazione della stessa Akt. Esempi delle fosfatasi coinvolte in questo tipo di meccanismo sono la PP2A (Protein Phosphatase 2A) che può agire direttamente su fosfo-Akt (Fig. 1.4) [Borgatti P, 2003; Liu W, 2003] e la famiglia di fosfatasi PP2C (nota come PHLPP) in grado di rimuovere il fosfato dalla Ser473 di Akt [Gao T, 2005].

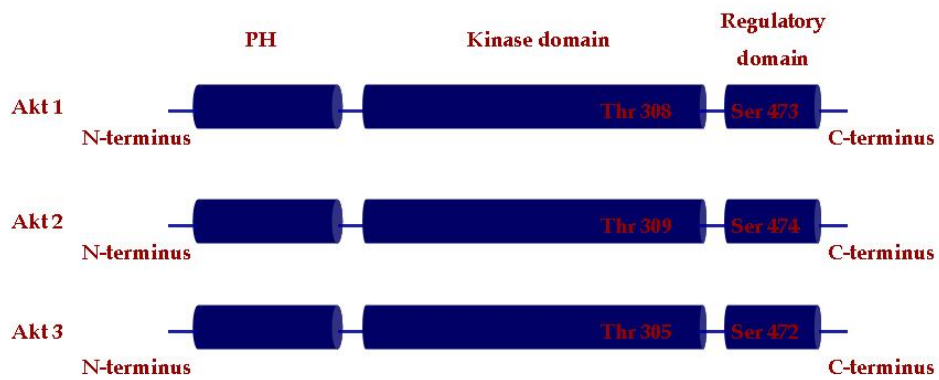


Fig. 1.3 Domini strutturali di Akt. Le Isoforme. Akt1, 2 e 3 mostrano la stessa organizzazione dei domini PH, chinasi e regolatorio e tutte possiedono due siti di fosforilazione fondamentali per la loro attività.

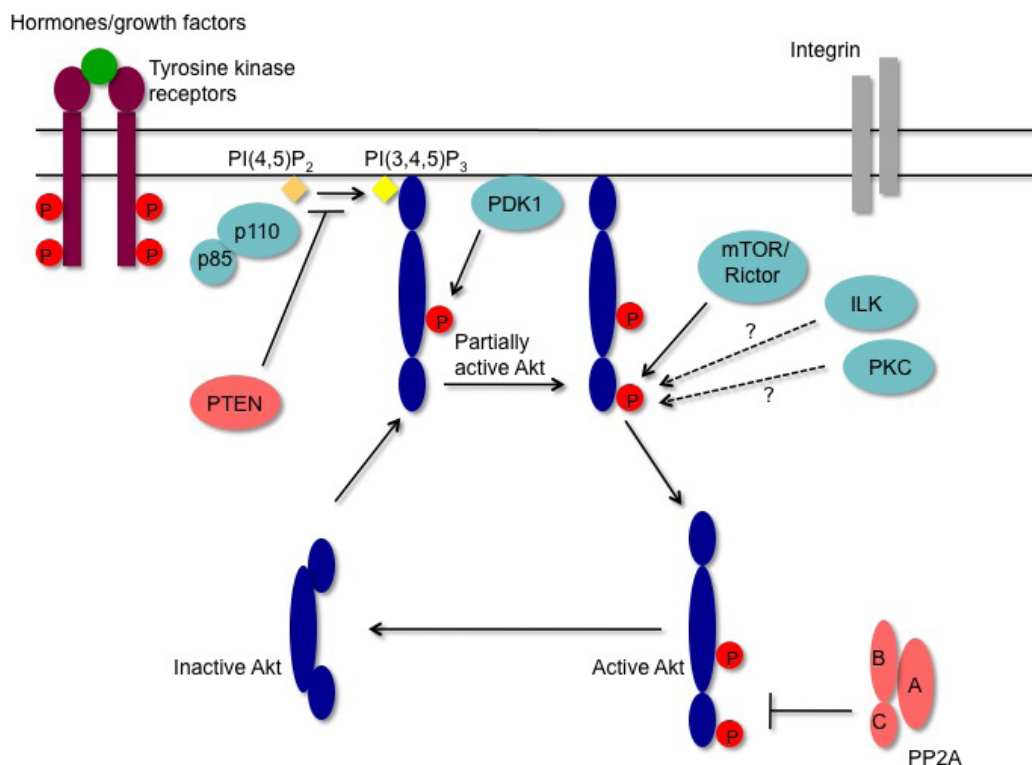


Fig. 1.4 Schema del meccanismo di regolazione di Akt.

1.4 Effetti biologici dell'attivazione di Akt

Il *pathway* della PI3K/Akt controlla numerosi e variegati fenomeni fisiologici; tuttavia, Akt assume un ruolo particolarmente importante nella regolazione di eventi, come la sopravvivenza, la proliferazione e la crescita cellulare che nel loro insieme bilanciano i segnali di sopravvivenza e di apoptosi [Vivanco I, 2002].

1.4.1 Bersagli anti-apoptotici della via PI3K/Akt

Akt è in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare in quanto tra i suoi *target* proteici, sia diretti sia indiretti, figurano diverse proteine coinvolte nel processo apoptotico (Fig. 1.5).

Il segnale di sopravvivenza cellulare che viene trasmesso a seguito dell'attivazione di Akt si esplica attraverso una duplice via: l'inattivazione di segnali pro-apoptotici e viceversa, l'attivazione di segnali anti-apoptotici.

Akt, infatti, esercita parte della sua attività anti-apoptotica prevenendo il rilascio del citocromo C dai mitocondri mediante fosforilazione e conseguente inattivazione dei

fattori pro-apoptotici Bad (un membro della famiglia Bcl-2) e della caspasi-9 [Thompson JE, 2004]. Inoltre, è stato dimostrato che il trattamento con LY294002, inibitore della PI3K, è in grado di ridurre i livelli di fosforilazione di Bad sulla Ser136 ed indurre quindi apoptosi in blasti di AML caratterizzati da un'attivazione costitutiva dell'asse PI3K/Akt [Zhao S, 2004]. Un simile meccanismo di regolazione da parte di Akt è stato dimostrato anche per YAP (Yes-associated protein), la cui fosforilazione da parte di Akt è in grado di ridurre l'espressione della proteina pro-apoptotica Bax [Basu S, 2003]. Un altro importante mediatore di apoptosi di cui Akt è in grado di influenzare l'espressione è SAPK/JNK (Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase); questa chinasi è attiva in cellule esposte ad una grande varietà di stimoli nocivi, inclusi agenti chemioterapici. Akt può interferire con questo *pathway* e inibire l'apoptosi, fosforilando e inattivando ASK1, una chinasi a monte di JNK [Hanada M, 2004].

D'altro lato, fra i bersagli di Akt vanno annoverati anche proteine di tipo anti-apoptotico, tra cui I- κ B kinase (IKK) che induce la degradazione dell'inibitore di NF- κ B, I- κ B [Aggarwal BB., 2004; Shishodia S, 2002]; e i fattori trascrizionali FoxO.

NF- κ B (nuclear factor-kappaB) è un fattore trascrizionale in grado d'indurre l'espressione di numerose proteine anti-apoptotiche quali cIAP-1 e 2, XIAP e TRAFs. Nello stato inattivo per interazione con I- κ B, NF- κ B si trova all'interno del citoplasma, ma una volta degradato il suo inibitore, NF- κ B diventa libero di migrare nel nucleo. Il nostro laboratorio ha precedentemente dimostrato che l'asse PI3K/Akt è in grado di regolare l'espressione di geni dipendenti da NF- κ B in cellule HL-60 [Bortol R, 2003; Tabellini G, 2005]; inoltre l'iper espressione di NF- κ B è stata anche documentata in blasti di AML con attivazione costitutiva dell'asse PI3K/Akt [Grandage VL, 2005 Birkenkamp KU, 2004; 18:103-112].

I fattori FoxO, invece, si trovano principalmente localizzati all'interno del nucleo dove attivano la trascrizione di geni pro-apoptotici come quello per il ligando Fas (FasL) e per Bim. Se fosforilati da Akt, questi fattori vengono inattivati a seguito della loro traslocazione nel citoplasma grazie a *chaperon* molecolari 14-3-3 [Arden KC, 2002; Van Der Heide LP, 2004].

1.4.2 Il *pathway* PI3K/Akt e la regolazione del ciclo cellulare

Akt interviene a regolare la proliferazione delle cellule agendo su elementi proteici che fanno parte del macchinario di controllo del ciclo cellulare (Fig.1.5).

Tra questi, uno dei *targets* di Akt è p27Kip1, un diretto inibitore di cdk2 (cyclin-dependent kinase 2) responsabile a sua volta dell'attivazione dei fattori trascrizionali E2F1 che promuovono la replicazione del DNA [Sherr CJ, 1999]. Una volta fosforilato da Akt sulla Thr157, p27Kip1 localizza nel citoplasma dove non può più esercitare la sua funzione inibitoria; pertanto la cdk2 non è inibita ed il DNA viene duplicato. [Du K, 2005].

Il controllo di Akt sul ciclo cellulare può avvenire anche tramite l'inibizione dei fattori trascrizionali FoxO che nel nucleo sono in grado di regolare l'espressione di geni che promuovono l'arresto del ciclo cellulare in fase G1/S (come lo stesso p27Kip1 o p21Waf/Cip1) [Medema RH, 2000; Seoane J, 2004; Kops GJ, 2002] o regolando l'espressione della ciclina D1 e D2

[Ramaswamy S, 2002; Schmidt M, 2002].

1.4.3 Il *pathway* PI3K/Akt e il metabolismo cellulare

La serina/treonina chinasi mTOR regola i processi di traduzione proteica in risposta a fattori di crescita e nutrienti fosforilando componenti del macchinario traduzionale come p70S6K, una chinasi ribosomale e il fattore trascrizionale 4EBP1. La regolazione di mTOR da parte di Akt è un processo complesso che coinvolge diverse proteine. Una di queste molecole, coinvolta nel controllo della crescita cellulare direttamente inattivata da Akt è TSC2 (tuberous sclerosis 2); nello stato non fosforilato, TSC2 eterodimerizza con TSC1 per promuovere l'attività GTPasica di Rheb (Ras homologue enriched in brain), il quale, una volta associato a GTP, promuove l'attivazione della chinasi mTOR, la quale si comporta da sensore di nutrienti (quali glucosio e amminoacidi) e media vari segnali di crescita cellulare generati dall'attivazione della PI3K [Li Y, Corradetti MN, et al. 2004; Hay N and Sonenberg N, 2004].

L'attività di Akt si eplica, in questo contesto, inibendo TSC2 e provocando in questo modo una diminuzione dell'idrolisi del GTP da parte di Rheb con conseguente aumento dei complessi Rheb-GTP in grado di attivare mTOR.

Nello stato attivo, mTOR dà vita a due differenti complessi multiproteici.

Il primo (complesso TOR rapamicina-sensibile o mTORC1) è costituito da Raptor (regulatory associated protein of TOR) e G β L (G-protein β -subunit-like) e fosforila la chinasi S6 (S6K) e l'inibitore 4E-BP1 (eucaryotic translation-initiation factor 4E-inhibitory binding protein) [Kim DH, et al.. 2002; Kim DH, et al.. 2003; Fingar DC], entrambi coinvolti nella regolazione della sintesi proteica. S6K, infatti, attiva la traduzione di mRNA fosforilando la proteina S6 del complesso ribosomiale 40S, mentre la fosforilazione e inibizione di 4E-BP1 consente il rilascio del fattore eIF-4E che può così prendere parte alla formazione di un complesso d'inizio della traduzione.

Assieme a Rictor, mTOR dà vita ad un secondo complesso (complesso TOR rapamicina-insensibile o mTORC2) che può sia mediare segnali al citoscheletro sia fosforilare Akt sulla Ser473, innescando un *feedback* positivo [Jacinto E, et al.., 2004; Sarbassov DD, Guertin DA, et al.., 2005]. Un altro importante substrato di Akt nella regolazione del metabolismo cellulare è la proteina GSK3 β che fosforila, inattivandola, la glicogeno sintasi a seguito di stimolazione insulinica. Akt è in grado di fosforilare GSK3 β sulla serina in posizione 9 inattivandola [Hardt SE, Sadoshima J., 2002]. Alti livelli di espressione della GSK3 β sono stati, infatti, riscontrati in blasti di AML recanti una iperfosforilazione di Akt [Bennett RL, Blalock WL, et al.., 2006].

1.5 La via di segnalazione delle MAP chinasi nelle malattie ematologiche

Le Mitogen-Activated Protein (MAP) chinasi sono un gruppo di serina/treonina chinasi che mediano numerosi segnali regolatori. Esistono tre gruppi principali di MAP chinasi: la famiglia delle MAP chinasi p38, la famiglia delle chinasi regolate dai segnali extracellulari (Erk) e la famiglia delle chinasi N-terminali

c-Jun (JNK) [Platanias, 2003]. I membri delle diverse MAP chinasi partecipano alla generazione di diverse risposte cellulari che comprendono la trascrizione, l'induzione della morte cellulare o il mantenimento della sopravvivenza cellulare, la trasformazione maligna e la progressione del ciclo cellulare [Platanias, 2003].

Negli ultimi anni, numerosi lavori hanno stabilito che la via di segnalazione delle MAP chinasi, gioca un ruolo critico nella patogenesi di numerose malattie ematologiche. E' stato dimostrato che la via di Raf/MEK/Erk è strettamente collegata alla via di PI3K/PTEN/Akt, perchè la proteina Ras è in grado di regolare entrambe le vie [McCubrey et al.., 2006].

L'attivazione della cascata delle MAP chinasi ed in particolare della via Raf/Erk/MEK, avviene in seguito al legame di fattori di crescita a livello dei recettori tirosin-chinasi localizzati sulla membrana, che dimerizzano ed interagiscono con delle proteine G, rappresentate da Ras per la via di Erk e dai membri della famiglia Rho per la via di JNK e p38. Queste proteine sono dotate di attività GTP-asica e promuovono la fosforilazione delle proteine a valle, tra cui Raf che viene reclutata a livello della membrana e fosforilata.

A sua volta Raf fosforila MEK, che è in grado di attivare Erk mediante fosforilazione. Quest'ultima può attivare numerosi fattori trascrizionali, tra cui c-Myc e CREB, che sono coinvolti nella proliferazione e nella prevenzione dell'apoptosi. Un'altra importante funzione di Erk è quella di fosforilare alcune molecole regolatrici dell'apoptosi localizzate nel mitocondrio, tra cui Bim, Bax, Bcl-2, Bad [McCubrey *et al.*, 2006].

La via di Stress-Activated Protein Kinase (SAPK)/ c-Jun NH₂ terminal Kinase (JNK) è attivata in seguito a stimolazione recettoriale da parte di citochine infiammatorie, radiazioni γ e raggi UV. Oltre che da proteine con attività GTP-asica, SAPK/JNK può essere attivata da diversi fattori, tra cui ASK1, MKK7, MKK4. In seguito alla sua fosforilazione, SAPK/JNK trasloca nel nucleo e regola la trascrizione cellulare modulando c-jun ed altri fattori di trascrizione [Brozovic *et al.*, 2004].

Studi recenti hanno suggerito la possibile esistenza di interazioni tra la via di PI3K/Akt e quella di SAPK/JNK, poiché Akt può regolare numerose proteine che sopprimono l'attività di JNK, tra queste MLK3 JNK-interacting protein 1 e MKK4. Inoltre si è visto che Akt può fosforilare direttamente ASK1 ed inibire JNK [Li *et al.*, 2006].

Recentemente è stato scoperto che Erk1/2 e gli effettori a monte, sono costitutivamente attivati nelle AML, inoltre Erk risulta over-espresso nella maggior parte dei casi di leucemia acuta e questo ha suggerito che l'over-espressione e l'attivazione costitutiva di Erk contribuiscono all'anormale crescita cellulare [Platanias, 2003]

Nelle leucemie linfoblastiche acute, l'attivazione di Raf/MEK/ERK è dovuta ad una mutazione del gene N-Ras o K-Ras [Platanias, 2003]

MEK/Erk sono coinvolte anche nella patogenesi della leucemia mieloide cronica, in quanto sono implicate nella trasformazione da parte del proto-oncogene BCR-ABL [Platanias, 2003]

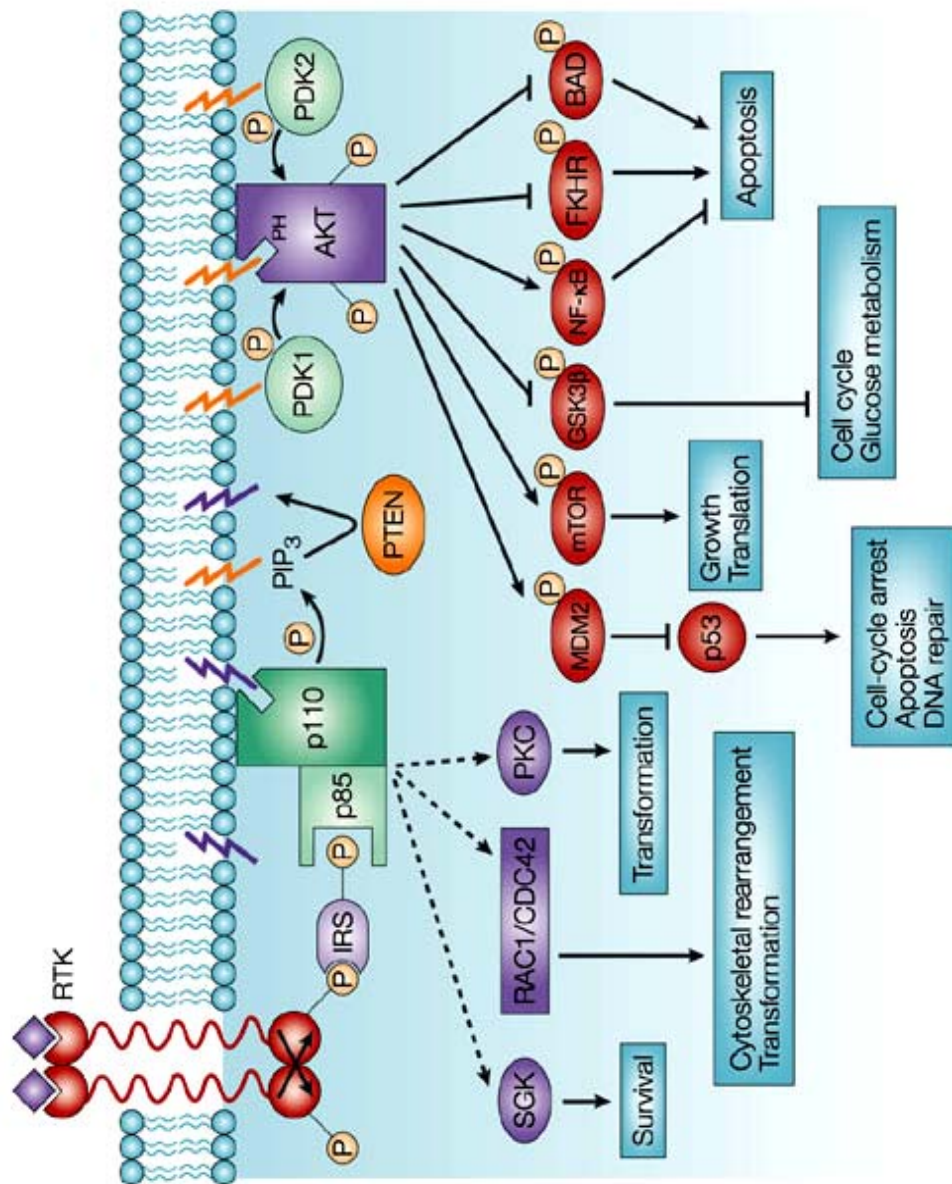


Fig. 1.5 Rappresentazione schematica della via di trasduzione del segnale di PI3/Akt

1.6 La via di segnalazione PI3K/Akt nelle leucemie umane

L'importanza del *pathway* PI3K/Akt nel promuovere la sopravvivenza e la proliferazione cellulare rendono questa via di segnalazione un punto chiave nell'insorgenza di molte forme tumorali quali ad esempio glioblastoma, leucemie, melanoma, cancro del polmone, della prostata e del fegato. L'attivazione costituiva della via PI3K/Akt è, infatti, una caratteristica comune nelle leucemie mieloidi acute (AML) [Martelli AM, Tabellini G, et al., 2005; Martelli AM, Nyakern M, et al., 2006; Kubota Y, Ohnishi H, et al., 2004; Xu Q, Simpson SE, et al., 2003; Grandage VL, Gale RE, et al., 2005; Tazzari PL, Cappellini A, et al., 2004].

Le AML rappresentano circa l'80% delle leucemie dell'adulto e costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie ematologiche maligne caratterizzate da una proliferazione incontrollata di cloni neoplastici e dall'accumulo, nel midollo osseo, di blasti con un programma di differenziamento fortemente alterato e resistenti alla morte cellulare.

Dal 50 al 70% dei pazienti con AML mostrano fosforilazione sia sulla Thr308 che sulla Ser473 di Akt e l'attivazione di questa chinasi nei blasti sembra legata a quella di PI3K [Liu W, Akhand AA, et al., 2003], anche se l'esatto meccanismo che porta all'iperattivazione di PI3K/Akt resta ancora da chiarire.

Circa il 15-25% delle AML totali presentano mutazioni puntiformi nei geni N-Ras e K-Ras che determinano la formazione di proteine costitutivamente attive. Dal momento che Ras attiva il *pathway* PI3K/Akt sia direttamente che indirettamente (mediante la via Raf/MEK/Erk), l'effetto finale di tali mutazioni è un forte potenziamento di questa via di segnalazione [Steelman LS, Pohnert SC, et al., 2004; Minami Y, Yamamoto K, et al., 2003].

Altre modificazioni che portano ad un aumento nell'attività di PI3K/Akt nelle AML interessano le RTK. Un esempio è dato da FLT3, un membro della classe III dei recettori tirosin chinasi che localizza preferenzialmente sulla superficie dei progenitori ematopoietici e viene espresso nelle cellule stromali del midollo osseo. Nel 20-25% dei casi delle leucemie mieloidi acute in questa proteina si riscontra una duplicazione nel dominio giustapposto alla membrana (ITD(internal tandem duplication)), la quale determina un'attivazione ligando-indipendente del recettore e una iper-stimolazione dei *pathway* a valle, tra cui PI3K/Akt [Minami Y, Yamamoto K, et al., 2003]. In generale, mutazioni attivanti FLT3 sono la seconda causa più frequente di insorgenza di AML e pazienti portanti mutazioni di questo recettore

hanno frequentemente una prognosi peggiore di quelli recanti un recettore FLT3 *wilde-type* [Naoe T, Kiyoi H 2004].

Circa l'80% dei pazienti affetti da AML presentano, inoltre, l'attivazione di c-Kit, un altro recettore tirosin chinasi di classe III.

Recentemente è inoltre emersa nei blasti di alcuni pazienti affetti da AML la presenza di elevati livelli di espressione della subunità catalitica di PI3K p110 δ , mentre le forme α e β hanno espressioni più variabili, anche se in alcuni casi si presentano abbastanza alti. Tuttavia, in queste cellule non state trovate mutazioni nel gene codificante per p110 δ [Cornillet-Lefebvre P, et al.. 2006], mentre amplificazioni o mutazioni attivanti la p110 sono frequenti in tumori solidi del polmone, del fegato e dell'apparato gastrico. In pazienti con AML è stata riscontrata, inoltre, una frequenza elevata di mutazioni nel locus 5q12-q13, dove localizza il gene per p85 α .

Un altro elemento di questo *pathway* che presenta modificazioni nelle AML è PTEN. Circa il 75% dei pazienti affetti da questa forma di leucemia hanno una fosforilazione sul dominio regolatorio C-terminale di PTEN, modificazione che rende la proteina più stabile, ma meno attiva nei confronti del suo substrato PtdIns(3,4,5)P3 [Vazquez F, Grossman SR, et al.. 2001]. Inoltre, in alcuni pazienti i livelli d'espressione di PTEN sono bassi o assenti [Xu Q, et al. 2003], anche se non sempre ciò sembra essere correlato alla fosforilazione di Akt. Infine, un altro elemento probabilmente coinvolto nella attivazione del *pathway* PI3K/Akt nelle AML è stato recentemente identificato nel VEGF (vascular endothelial growth factor); questa è una molecola a potente azione angiogenetica in grado di regolare la sopravvivenza, la motilità e la proliferazione delle cellule endoteliali [Daher A, Longuet M, et al.., 2001]. Assume pertanto particolare interesse il fatto che blasti di pazienti affetti da AML presentino recettori per il VEGF e siano inoltre in grado di sintetizzarlo e secernerlo [Gutiérrez NC, et al.., 2005]. Usando cellule KG1 e HL-60 è stato, inoltre, possibile dimostrare che il VEGF, attraverso attivazione della PI3K (il processo è infatti revertito dalla wortmannina) è in grado di indurre la fosforilazione di Akt.

1.6.1 L'inibizione dell'asse PI3K/Akt come terapia delle leucemie

Il ruolo fondamentale della via PI3K/Akt nell'opporsi all'apoptosi cellulare ha portato ad uno studio intenso sul contributo di questa via alla sopravvivenza dei tumori cellulari in risposta a vari tipi di trattamenti terapeutici.

L'importanza di PI3K/Akt nel causare resistenza a farmaci di solito usati nel trattamento chemioterapico delle AML è stato per la prima volta dimostrato da O' Gorman et al.,2000. Questi autori hanno utilizzato le cellule leucemiche HL60 AR per dimostrare che la wortmannina o LY294002, inibitori di PI3K, portano a una diminuzione nell'attività di Akt e aumentano la sensibilità ad etoposide e doxorubicina.

Un possibile approccio terapeutico per l'inibizione di Akt è quello di "colpire" il suo dominio PH, interferendo quindi con il legame del fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato e quindi con la successiva traslocazione di Akt a livello della membrana cellulare. A questo scopo negli ultimi anni sono stati sviluppate piccole molecole; tra queste figurano gli analoghi del fosfatidilinositolo e gli alchil-lisofosfolipidi tra cui la perifosina [Martelli et al., 2006].

1.6.1.1 Inibitori di PI3K

Sono stati studiati due inibitori classici e non selettivi di PI3K: wortmannina, antibiotico isolato da *Penicillium wortmanni* e LY294002, un derivato sintetico dei flavonoidi [Martelli et al., 2006].

Sia in vivo che in vitro, questi inibitori hanno mostrato una buona capacità di indurre l'apoptosi e di aumentare la sensibilità a farmaci chemioterapici [Martelli AM 2005]

La wortmannina inibisce irreversibilmente PI3K, modificando una Lisina 802 sulla subunità catalitica p110, invece LY294002 è un inibitore reversibile che compete con l'ATP a livello del sito catalitico di PI3K.

Nonostante la loro capacità di inattivare la cascata di PI3K/AKT, l'utilizzo di questi inibitori è, però, limitato dagli effetti collaterali [Martelli et al., 2006].

Tra gli inibitori selettivi, quello con maggiore attività è l'IC87114, che provoca un decremento della fosforilazione di AKT attraverso il suo legame alla subunità catalitica p110 δ di PI3K [Martelli et al., 2006].

1.6.1.2 Inibitori di Akt

Un primo passo nell'inibizione di Akt è stato fatto utilizzando molecole di basso peso molecolare che fossero in grado di inibire l'attività catalitica della molecola;

i principali inibitori delle chinasi sono, però, inibitori competitivi per ATP il cui sito di legame è un dominio estremamente conservato fra le chinasi. Questo ha comportato, pertanto, una mancanza di specificità nell'azione inibitoria di Akt e la ricerca di un possibile approccio alternativo.

Recentemente ha assunto sempre maggior consistenza l'idea di inibire Akt inattivando il suo dominio PH, ed interferendo con il legame del fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato e quindi con la sua traslocazione a livello della membrana cellulare. Questo approccio garantirebbe, inoltre, una maggiore specificità in quanto le isoforme di Akt presentano riguardo il dominio PH solo il 30% di analogia con altre proteine presentanti lo stesso dominio [Kumar CC, Madison V. 2005]. Gli analoghi del fosfatidilinositolo sono in grado di inibire questa interazione in quanto non possono essere fosforilati da PI3K. Quindi agiscono come competitori per l'attivazione di Akt e la sua traslocazione alla membrana [Martelli et al., 2006]. Questi composti hanno come principale effetto collaterale l'emolisi, per cui recentemente sono stati testati altri inibitori, tra cui la perifosina [Martelli et al., 2006].

1.7 La perifosina

La perifosina è un nuovo farmaco sintetico appartenente alla classe degli alchilfosfolipidi. La perifosina è un analogo dei fosfolipidi di membrana che presenta un residuo ciclico alifatico alchilico legato al gruppo fosfato. Essa è recentemente entrata in fase II della sperimentazione clinica per il trattamento di alcuni tumori, in quanto ha dimostrato di avere attività antineoplastica in numerosi tipi di neoplasie, sia in vivo che in vitro [Kondapaka et al., 2003].

La perifosina, così come altri analoghi dei fosfolipidi (eldefosina e miltefosina), ha dimostrato di avere effetti pro-apoptotici in quanto interferisce con il turnover e la sintesi dei fosfolipidi di membrana e blocca la sopravvivenza delle cellule tumorali [Ruiter et al., 2003].

1.7.1 Meccanismo d'azione

La perifosina, a differenza della maggior parte dei farmaci antitumorali che agiscono sul DNA, ha effetto sui processi di segnalazione a livello delle membrane cellulari [Vink et al., 2005].

Recenti studi hanno dimostrato un'attività di inibizione dose-dipendente su AKT, una proteina chinasi coinvolta nei processi di sopravvivenza delle cellule tumorali [Kondapaka et al., 2003].

Infatti il *network* di segnalazione PI3K/AKT è di fondamentale importanza per la regolazione del ciclo cellulare, la proliferazione ed l'apoptosi e la sua attivazione costitutiva è associata con numerose neoplasie maligne [Nyåkern et al., 2006].

La perifosina, così come tutti gli analoghi degli alchilfosfolipidi, è un inibitore selettivo della fosforilazione di Akt. Essa agisce legandosi al dominio PH di Akt, impedendo così al fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato, prodotto dalla PI3K, di interagire con Akt e di ancorarla a livello della membrana cellulare [Kondapaka et al., 2003].

In uno studio effettuato su cellule leucemiche T (Jurkat), la perifosina ha dimostrato di avere effetti antiproliferativi ed inoltre di provocare un aumento della morte cellulare, associato ad una riduzione di fosfo-Akt Ser 473 [Nyåkern et al., 2006].

Da alcuni studi, è emerso che la perifosina può arrestare il ciclo cellulare attraverso l'induzione di p21 Waf/Cip1, un inibitore delle cdk, che, legandosi ad esse, blocca la progressione attraverso lo stadio G1/S e G2-M del ciclo cellulare [Ruiter et al., 1999; Patel et al., 2002].

Inoltre, la perifosina può inibire la via anti-apoptotica di ERK ed attivare quella pro-apoptotica di JNK, alterando il bilancio tra la via di sopravvivenza e quella della morte cellulare, e favorendo così l'apoptosi. Infatti alcuni studiosi, [Ruiter DJ et al., 2003], usando cellule di melanoma, hanno dimostrato che l'inibizione della via di PI3K/AKT può prevenire l'attivazione di Erk1/2, e può attivare la via SAPK/JNK, che gioca un ruolo importante nell'induzione dell'apoptosi.

Nondimeno, esistono in letteratura lavori che indicano come la perifosina sia in grado di attivare Erk1/2. Ad esempio, in cellule T-linfoblastoidi Jurkat, l'esposizione a basse concentrazioni di perifosina per tempi lunghi o a più alte concentrazioni per tempi brevi, comportava l'attivazione transitoria della via della MAP chinasi e l'aumento dei livelli di fosfo-Erk 1/2 [Nyåkern et al., 2006].

Inoltre, il trattamento di cellule di mieloma multiplo con perifosina, provocava un aumento della fosforilazione di MEK ed Erk secondo una modalità tempo- e dose-dipendente. Trattando queste cellule contemporaneamente con perifosina e U0126

(un inibitore farmacologico di MEK), si aveva una riduzione della fosforilazione di Erk e quindi veniva potenziato l'effetto citotossico indotto dalla perifosina [Hideshima et al., 2006].

Il trattamento di cellule di mieloma con la perifosina innesca anche l'attivazione di un altro gruppo di MAP chinasi, cioè JNK, seguita dal clivaggio delle caspasi 8 e 9, dalla proteolisi di PARP (*poly ADP-ribose polymerase*) e infine, dall'apoptosi [Hideshima et al., 2006]

Recenti studi hanno dimostrato che la perifosina e il suo analogo eldefosina, inducono selettivamente l'apoptosi nelle cellule leucemiche grazie all'attivazione del recettore della morte Fas/CD95. Questo recettore, così come tutti quelli appartenenti alla superfamiglia dei recettori del Tumor Necrosis Factor (TNF), in seguito all'interazione con il suo ligando o con anticorpi agonisti, ha la capacità di trasmettere segnali apoptotici attraverso la presenza di un dominio di morte nella sua porzione citoplasmatica. Al contrario dei domini citoplasmatici degli altri recettori coinvolti nella trasduzione del segnale, la porzione intracellulare di Fas media la segnalazione attraverso l'interazione proteina-proteina [Gajate et al., 2007].

L'attivazione di Fas/CD95 comporta una dimerizzazione del recettore ed il reclutamento a livello della membrana della molecola adattatrice FADD (*Fas-associated death domain-containing protein*) attraverso l'interazione del suo dominio di morte con quello del recettore. FADD, a sua volta, contiene un dominio effettore di morte che si lega ad un analogo dominio ripetuto in tandem e presente sulla pro-caspasi 8. La formazione di questo oligomero è necessaria per l'attivazione della pro-caspasi 8, che, attraverso un taglio auto-catalitico, si trasforma in caspasi 8. L'aggregato Fas/CD95, FADD, pro-caspasi 8 forma il cosiddetto complesso DISC (*death-inducing signaling complex*). La caspasi 8 media l'attivazione delle caspasi effettrici a valle (tipo la caspasi 3), che conducono all'apoptosi [Gajate et al., 2007]. Inoltre, la caspasi 8 porta all'attivazione della via mitocondriale dell'apoptosi, incentrata sulla caspasi 9 [de Vries et al., 2007].

E' stato inoltre dimostrato che, oltre all'attivazione delle caspasi, il trattamento con perifosina di cellule Jurkat portava ad una variazione dell'espressione di alcune proteine che agiscono nel mitocondrio, tra cui Bid, Bim e Bcl-XL. Infatti la caspasi 8 e la caspasi 3 possono attivare la forma citosolica di Bid mediante clivaggio: il frammento attivo di Bid interagisce con la proteina pro-apoptotica Bax, presente nel mitocondrio, la quale induce il rilascio del citocromo c. Inoltre, la caspasi 3 può indurre anche il clivaggio di Bim, producendo un frammento con elevata attività pro-

apoptotica che è in grado di antagonizzare la funzione anti-apoptotica di Bcl-2 e Bcl-xL, attraverso un'interazione diretta [Nyåkern et al., 2006].

1.7.2 Farmacocinetica

Vink e colleghi (2005) hanno condotto uno studio sulla farmacocinetica della perifosina per stabilire la via di somministrazione del farmaco e le dosi da utilizzare nei trattamenti.

Da questa ricerca è emerso che la perifosina, in vitro, ha elevati livelli di accumulazione ed un'elevata sensibilità verso le cellule tumorali; in vivo, invece, mostra una buona distribuzione in tutti i tessuti in seguito a somministrazione orale ed una buona tollerabilità con una Massima Dose Tollerata (MTD) di 200 mg/die. *In vivo*, la perifosina è stata somministrata in una singola dose di 40 mg/Kg/die o in quattro dosi di 10 mg/Kg/die; confrontando i risultati si è riscontrata una concentrazione plasmatica di farmaco molto simile ma la biodistribuzione della perifosina è diversa in base alla dose somministrata [Vink et al., 2005].

Una singola somministrazione comporta elevati livelli di farmaco nello stomaco, intestino tenue, colon, fegato e reni dopo 8 ore dalla somministrazione. Basse concentrazioni sono state osservate in polmone, milza, cuore e cervello [Vink et al., 2005].

Studi preclinici e *trials* clinici di fase I hanno dimostrato che la perifosina è efficace a concentrazioni plasmatiche che variano da 5 a 20 $\mu\text{mol/L}$ [Hilgard et al., 1997; Van Ummersen et al., 2004].

Il trattamento per una durata di quattro giorni ha mostrato un aumento della concentrazione di perifosina in tutti gli organi dopo 96 ore dalla prima somministrazione. Nonostante la buona distribuzione tissutale, il trattamento con la perifosina è limitato da una tossicità gastro-intestinale causata da un accumulo di farmaco in seguito a somministrazione orale. Tuttavia, in seguito a ripetute somministrazioni di perifosina non è stata riscontrata una tossicità a livello del midollo osseo o mielosoppressione. In conclusione, in vivo, la perifosina viene assorbita nel tratto gastro-intestinale dopo circa 24 ore dalla somministrazione, non viene metabolizzata ma viene distribuita in tutto il corpo. Questo fa della perifosina il principale candidato per il trattamento di numerose neoplasie maligne, tra cui il carcinoma della laringe, della mammella, dell'intestino e della prostata [Vink et al., 2005].

1.7.3 Studi *in vitro*

La maggior parte degli studi *in vitro*, ha dimostrato che la perifosina somministrata a basse concentrazioni, provoca la morte cellulare in linee cellulari di carcinoma mammario, della laringe, del colon e del pancreas. Inoltre, potenzia l'apoptosi indotta dalla radioterapia in linee cellulari di leucemia umana [Van Ummersen *et al.*, 2004].

Altri studi *in vitro* hanno dimostrato l'effetto sinergico della perifosina in combinazione con farmaci citotossici. In un recente studio di Nyåker *et al.* (2006), è stato evidenziato per la prima volta che la perifosina ha un effetto sinergico con l'etoposide, un inibitore della topoisomerasi II, quando utilizzata per il trattamento di cellule leucemiche T Jurkat. Hideshima e collaboratori (2006) hanno, inoltre, dimostrato l'esistenza di un sinergismo fra perifosina e doxorubicina o melfalan in cellule di mieloma multiplo. Questi stessi autori hanno anche analizzato gli effetti combinati della perifosina e di un nuovo agente antineoplastico, il bortezomib, su cellule di mieloma multiplo. Questa combinazione provoca una potente riduzione della fosforilazione di Akt e di MEK/Erk ed un aumento dell'attivazione della via di JNK. Va ricordato che il bortezomib è un inibitore del proteasoma che è attualmente considerato un farmaco molto promettente per il trattamento di varie malattie ematologiche maligne [Kukreja *et al.*, 2007].

Rahmani *et al.*, (2005) hanno dimostrato il sinergismo tra la perifosina e gli inibitori della istone deacetilasi (HDAC) in alcune linee cellulari di leucemia umana (Jurkat, U937, HL60). Anche questa combinazione di farmaci induceva apoptosi mediante l'inibizione della via di Akt e di MEK/Erk.

Infine, la combinazione della perifosina e dell' UCN-01, un inibitore della PDK-1, provocava l'inibizione della crescita di linee cellulari di carcinoma prostatico e polmonare [Dasmahapatra *et al.*, 2004].

1.7.4 Studi clinici

1.7.4.1 *Trials* di FASE I

Alcuni studi in vivo, prevedevano l'utilizzo della perifosina, in diverse dosi, in una forma di carcinoma mammario indotto nel topo dal 7,12 dimetil-benz(α)antracene. Infatti, la perifosina potenzia l'attività antitumorale del cisplatino, adriamicina e ciclofosfamide, utilizzati in questa forma di tumore [Dasmahapatra et al., 2004].

La somministrazione di una singola dose orale (*loading dose*) di perifosina di 68.1mg/kg, causava l'inibizione della crescita cellulare per 14 giorni. Invece, la somministrazione giornaliera (per 25 giorni) di basse concentrazioni del farmaco (da 2.5 a 46.4mg/kg) causava un'inibizione della crescita a tutte le dosi testate, ma con un inizio di risposta alla terapia dose-dipendente. Gli effetti della terapia persistevano per più di 20 giorni dall'ultima somministrazione [Van Ummersen et al., 2004]. Considerando questi risultati, è stata sperimentata una combinazione di una singola dose di perifosina seguita da dosi giornaliere di mantenimento. Lo studio ha avuto come risultato una completa regressione della malattia senza compromettere la tollerabilità gastrointestinale [Van Ummersen et al., 2004].

Negli ultimi anni sono stati intrapresi tre *trials* di fase I per stabilire la tossicità, la farmacocinetica e la farmacodinamica della perifosina.

In uno studio di Crul et al., (2002) del Netherlands Cancer Institute, è stata utilizzata un protocollo di somministrazioni giornaliere orali su 22 pazienti con tumori solidi. Le dosi variavano da 50 a 200mg/die per tre settimane, seguite da una settimana di interruzione.

La dose limitata dalla tossicità (DLT) non venne raggiunta a causa delle complicanze gastrointestinali dovute alle dosi elevate e che hanno portato alla sospensione prematura della terapia. Venne stabilita una MDT di 150mg/die. L'attività antitumorale venne dimostrata con l'utilizzo di tutti i dosaggi, inoltre dei 10 pazienti trattati con una dose di 150mg/die, 3 mostrarono una remissione completa della malattia, 3 mostrarono una parziale risposta ed in 4 pazienti la malattia risultò stabile.

Gli altri due *trials* sono stati eseguiti negli Stati Uniti. In particolare, quello della University of Wisconsin Comprehensive Cancer Center prevedeva la somministrazione di una *loading dose* di 100mg per 4 volte (ogni 6 ore per il primo giorno) ed una dose di mantenimento di 50mg al giorno. La tossicità gastrointestinale comparve già in seguito alla *loading dose*, ma venne superata

facilmente con antiemetici ed antagonisti dei recettori della 5-idrossitriptamina. Al contrario, gli effetti collaterali dovuti alle dosi di mantenimento risultarono difficili da migliorare. Non vennero osservate né la mielosoppressione né l'alopecia, tipici effetti collaterali di quasi tutti gli agenti antitumorali [Van Ummersen et al., 2004].

1.7.4.2 Trials di FASE II

La perifosina è recentemente entrata in fase II della sperimentazione clinica [Kondapaka et al., 2003].

Alcuni studi di fase I raccomandano di utilizzare dosi di mantenimento di 150 mg al giorno, anche se dosi più basse hanno dimostrato di essere biologicamente attive e più tollerate [Van Ummersen et al., 2004].

Lo studio di fase II del National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group è stato condotto su un gruppo di pazienti affetti da melanoma maligno metastatico ed incurabili con la terapia standard.

Vennero effettuati due cicli di trattamento, ognuno della durata di 28 giorni:

1. I CICLO: *loading dose* di 450mg somministrata in due dosi separate, seguita da dosi di mantenimento di 150mg/die per 20 giorni e da 7 giorni di interruzione;
2. II CICLO: *loading dose* di 300 mg in singola dose, seguita da dosi di mantenimento di 150 mg/die per 20 giorni e da 7 giorni di interruzione.

Dai risultati ottenuti si è visto che la perifosina può essere somministrata con sicurezza mediante una *loading dose* e dosi di mantenimento di 150mg, per un ciclo completo di 28 giorni. In tutti i pazienti trattati sono stati osservati sintomi come vomito, diarrea, nausea, costipazione, astenia e lieve tossicità ematologica. Per quanto riguarda gli effetti sulle cellule neoplastiche, la perifosina sembra non avere attività antitumorale sulle cellule di melanoma [Ernst et al., 2005].

Altri *trials* di fase II hanno dimostrato l'attività clinica della perifosina nel carcinoma della mammella, nel cancro della prostata e nei carcinomi testa/collo [Ernst et al., 2005].

Da uno studio effettuato su 22 pazienti con sarcoma avanzato dei tessuti molli è emerso che il farmaco non aveva nessun effetto citotossico, in quanto solo 4 pazienti hanno mostrato una non-progressione della malattia mentre sui pazienti rimanenti la terapia non ha prodotto alcun miglioramento, anche se gli effetti collaterali sono uguali a quelli evidenziati dai *trials* di fase I. Quindi, come era stato già dimostrato per le cellule di melanoma, la perifosina ha attività antitumorale solo

in alcuni tipi di neoplasie, come le leucemie e il condrosarcoma, mentre non ha alcun effetto nel carcinoma metastatico delle cellule squamose, nel melanoma e nel carcinoma di testa/collo, e non è raccomandata come monoterapia [Knowling et al., 2006].

Nel 2006 è iniziato uno studio clinico di fase II per sperimentare l'efficacia della perifosina combinata con bortezomib o desametasone in pazienti con mieloma multiplo (<http://clinicaltrials.gov>).

1.8 L'Erufosina, una nuova alchilfosfocolina nella cura della leucemia mieloide acuta

Le alchilfosfocoline (APC), sono analoghi strutturalmente più semplici degli alchil-lisofosfolipidi e presentano una forte attività neoplastica in vitro e una buona tollerabilità in vivo.

La loro attività antineoplastica è stata per la prima volta evidenziata in cellule di carcinoma mammario di ratto [Hilgard et al. 1997] ed è stato dimostrato che l'edelfosina è in grado di indurre apoptosi in cellule di leucemia promielocitica acuta umana HL-60 [Diomede et al. 1993] ed in altri tipi di cellule neoplastiche *in vitro* [Mollinedo et al. 1997], mostrando anche una certa attività pro-apoptotica in modelli animali di topo e ratto. Grazie all'assenza del glicerolo nella loro struttura chimica, le alchilfosfocoline, non vengono metabolizzate dalle fosfolipasi e possono quindi raggiungere facilmente tessuti ed organi *in vivo* [Erdlenbruch et al 1998].

Il loro esatto meccanismo di azione deve essere ancora chiarito ma, a differenza dei chemioterapici classici che hanno come *target* il DNA, le alchilfosfocoline interagiscono attivamente con la membrana plasmatica, regolandone la composizione e modulando i *pathways* di trasduzione del segnale che si originano da essa. Inoltre, a differenza dei chemioterapici convenzionali, le alchilfosfocoline non danno mieolossicità ed anzi stimolano la crescita dei progenitori ematopoietici [Berkovic et al., 2001].

Studi preliminari [Konstantinov et al., 1998] hanno dimostrato che l'efficacia della loro attività antineoplastica su linee cellulari di leucemia umana è direttamente proporzionale alla lunghezza della catena alchilica della molecola: le alchilfosfocoline caratterizzate da una catena alchilica più lunga esercitano un'attività citotossica maggiore di quelle che presentano una catena alchilica a minor atomi di carbonio.

Rispetto alla miltefosina che ha mostrato una forte attività antitumorale *in vitro*, ma che può essere somministrata solo per via orale per via dell'emolisi che provoca se somministrata per via endovenosa, [Kotting J. et al., 1992], l'erufosina è il primo derivato degli APC che può essere somministrato per via endovenosa [Eibl H. et al., 1995; Erdlenbruch et al. 1999].

Per questo motivo la miltefosina non è più usata nelle terapie antineoplastiche, ma è largamente utilizzata come farmaco contro le leishmaniosi tropicali.

L'erufosina, invece, in esperimenti di farmacocinetica eseguiti sul ratto, ha dimostrato di riuscire ad oltrepassare la barriera emato-encefalica e di accumularsi nel cervello raggiungendo concentrazioni tali da uccidere le linee cellulari di GBM (glioblastoma) umano *in vitro*.

Tutto questo è possibile in virtù delle differenze strutturali esistenti tra erufosina e miltefosina: l'erufosina infatti presenta una catena alchilica più lunga e un doppio legame, che influenzano la sua attività farmacologica.

Queste relativamente piccole differenze strutturali aumentano l'idrofobicità della molecola portando alla formazione di strutture lamellari di membrana che riducono la tossicità emolitica della molecola e permettono a tale farmaco di essere somministrato per via endovenosa. [Berger MR et al., 1998; Erdlenbruch B. et al. 1999].

Studi preclinici hanno permesso di dimostrare come l'erufosina sia un farmaco promettente nella cura dei tumori cerebrali sia *in vivo* sia *in vitro* [Erdlenbruch B. et al. 1998, 1999].

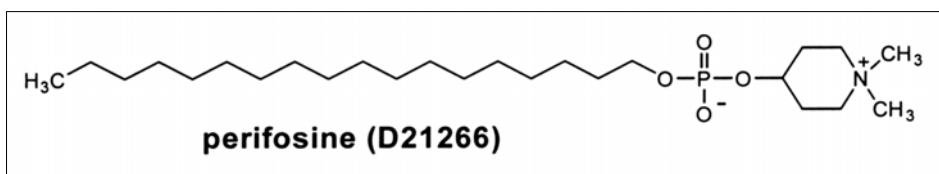


Fig. 1.6 Struttura chimica della perifosina

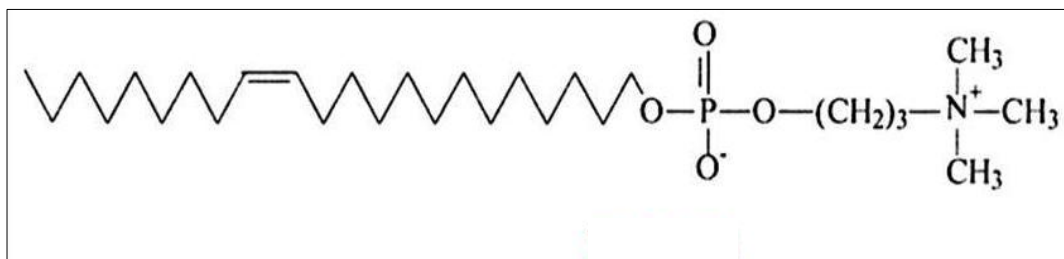


Fig. 1.7 Struttura chimica della Erucilfosfomocolina, Erufosina o ErPC3.

II SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo studio è stato quello di dimostrare attraverso esperimenti *in vitro* ed *in vivo* l'attività antineoplastica e citotossica di un nuovi farmaci, quali la perifosina e l'erufosina (ErPC3), nel trattamento delle leucemie mieloidi acute (AML).

I *Synthetic alkyl-lysophospholipids* (ALPs) tra cui la perifosina costituiscono un gruppo eterogeneo di fosfolipidi di sintesi con differenti effetti biologici tra cui l'inibizione dell'invasione di cellule tumorali, l'induzione alla differenziazione cellulare e l'apoptosi. Sono molecole permeabili caratterizzate da una lunga catena alchilica che ne facilita l'inserimento all'interno della membrana plasmatica. Inoltre, poiché non vengono generalmente idrolizzati dalle lipasi cellulari, gli ALPs vengono facilmente accumulati a livello dei *lipids-rafts* della membrana plasmatica, interferendo da un lato con il fisiologico *turn-over* dei fosfolipidi di membrana e dall'altro impedendo la traslocazione di Akt alla membrana e la sua seguente attivazione.

Nonostante la sua buona distribuzione tissutale, il trattamento con perifosina è, però, limitato da una tossicità dose-dipendente soprattutto a livello gastro-intestinale a seguito di una somministrazione orale del farmaco.

Le alchilfosfocoline (APC), rappresentano invece, una nuova classe di farmaci citostatici che, a differenza dei precedenti alchilfosfolipidi possono essere somministrati per via intravenosa in quanto non causano emolisi e possono essere utilizzate nell'uomo a concentrazioni plasmatiche più elevate avendo meno effetti collaterali.

L'erufosina oltrepassa la barriera emato-encefalica e si accumula nel cervello raggiungendo concentrazioni tali da indurre in apoptosi le linee cellulari di glioblastoma umano *in vitro*.

Questo è possibile grazie alla struttura idrofobica di tale molecola che ha una catena alchilica più lunga e un doppio legame. Tale struttura determina la formazione di strutture lamellari di membrana che riducono la tossicità emolitica della molecola e ne permettono la somministrazione per via endovenosa.

Inoltre, rispetto ai chemioterapici tradizionali le alchilfosfocoline non danno mielotossicità ed anzi stimolano la crescita di progenitori emopoietici.

Gli studi preliminari hanno dimostrato che l'efficacia della loro attività antineoplastica su linee cellulari di leucemia umana è direttamente proporzionale alla lunghezza della catena alchilica della molecola.

Benché l'esatto meccanismo di azione resti ancora in parte da chiarire sembra che questi farmaci interagiscano con i lipidi della membrana cellulare e siano in grado di modulare vie di trasduzione del segnale intracellulare attraverso l'inibizione dei *pathways* delle MAP chinasi e di PI3K/Akt.

Gli esperimenti sono stati condotti su cellule di leucemia mieloide acuta umana THP-1, NB4 e HL-60 di leucemia promielocitica acuta ed e su cellule MV4-11 di leucemia mielomonocitica bifenotipica B.

Dapprima è stata effettuata un'analisi che permettesse di valutare la vitalità e l'apoptosi delle cellule esposte ai farmaci attraverso saggi di tipo MTT e colorazione citofluorimetrica con Annessina V. Successivamente si è cercato di indagare i meccanismi molecolari alla base dell'effetto citotossico di perifosina ed erufosina, analizzando gli effetti del farmaco sulla modulazione delle vie di segnalazione di Akt, MEK/Erk e sull'attivazione dell'apoptosi caspasi dipendente attraverso analisi in *western blot* e di valutare il possibile effetto di questi farmaci sul ciclo cellulare attraverso analisi citofluorimetrica a seguito di colorazione con PI.

Inoltre, blasti di pazienti affetti da AML sono stati trattati con perifosina da sola o in combinazione con etoposide, per valutare gli effetti pro-apoptotici e citotossici del farmaco *in vivo*.

Infine, allo scopo di determinare possibili interazioni con farmaci antineoplastici convenzionali sono stati condotti esperimenti combinati utilizzando l'Erufosina in associazione con etoposide, mitoxantrone e doxorubicina.

Questi studi preclinici potrebbero, infatti, indicare se l'ErPC3 e la perifosina da sole o in combinazione con altri farmaci rappresentino un possibile agente terapeutico nel trattamento delle AML.

III MATERIALI

La perifosina è stata gentilmente fornita dalla AEterna Zentaris GmbH (Frankfurt, Germany). La polvere è stata disciolta in H₂O ad una concentrazione finale di 50mM. Le aliquote sono state conservate a -20°C. mitoxantrone, etoposide e doxorubicina provengono dalla SIGMA-Aldrich Corporation (Frankfurt, Germania). Il mitoxantrone è stato sciolto in etanolo ad una concentrazione finale di 2mM; la doxorubicina è stata sciolta in acqua ad una concentrazione finale di 17.2mM mentre l'etoposide è stato sciolto in DMSO ad una concentrazione finale di 50mM. Le varie aliquote sono state conservate a

-20°C. La polvere di erufosina (gentilmente fornita dal Dr. L. Lindner University of Munich, Germania) è stata disciolta in acqua per dare una concentrazione finale di 20mM. Le aliquote sono state conservate a 4°C

Il kit per l'MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), è stato fornito dalla Roche Applied Science (Penzberg, Germania). Il Propidio ioduro (PI, DNA-Prep kit), è stato fornito dalla Beckman Coulter Immunology (Miami, FL, USA). L'Annessina V-FITC kit proviene dalla Tau Technologies BV (Kattendijke, Olanda) mentre i carboxyfluorescein

fluorescent-labeled inhibitor of caspases (FLICA) Apoptosis Detection Kits for caspase activity assay sono stati forniti dalla AbD Serotec (Oxford, UK).

Il granulocyte–macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), l'interleukin-3 (IL-3) e l'IL-6, sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich Corporation.

L'LY294002, il PD98059 l' SP600125 e l' L-JNKi peptide provengono dalla EMD Biosciences, (La Jolla, CA, USA). I seguenti anticorpi, tutti forniti dalla Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA), sono stati impiegati per le analisi con la tecnica del Western Blot: PI3K p110α (#4249), PI3K p110β (#3011) Akt (# 9272), Ser473 p-Akt (#9271), Thr308 p-Akt (#9275), Erk1/2 (#9102), Thr202/Tyr 204 p-Erk1/2 (#9106), Ser221 p-MEK 1/2 , p70S6K (#2708); Thr 389 p-p70S6K (#9206); Casp-2 (#2224), Casp-3 (#9665), Casp-6 (#9762); Casp-7 (#9492) Casp-8 (#9746), Casp-9 (# 9502), poly (ADP-ribose) polymerase (PARP, #9542); mTOR (#2972); Raptor (#4978); Rictor (#2114); Ser 241 p-PDK-1(#3061); Thr423 p-PAK-1 (p21 activated kinase-1) (#2601) beta-actina (#4967); Puma (#4976); McL-1(#4572); Aif(#4642); Survivin (#2803); Ser70 p-Bcl2 (#2827). L'anticorpo anti PI3Kδ (HPA009985) è stato fornito dalla SIGMA-Aldrich Corporation (Frankfurt, Germania). Gli anticorpi secondari coniugati alle perossidasi anti-rabbit e anti-mouse sono stati forniti dalla

Cell Signaling Technology, mentre l' ECL Plus Western Blotting Detection System dalla GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

Per le analisi in citofluorimetria Ser112 p-Bad; Alexa Fluor488 conjugate, Tyr591 p-FLT3 (3549), Alexa Fluor647 conjugate Ser473 p-Akt (2337), Alexa Fluor647 conjugate e anti-Thr202/Tyr204 p-Erk1/2, e Alexa Fluor647 conjugate, Thr183/Tyr185 p-JNK conjugate sono stati forniti dalla Cell Signaling Technology mentre gli anticorpi FITC-conjugated anti-Fas and anti-FasL sono stati forniti dalla Ancell, (Bayport, MN, USA). Il FITC-conjugated mouse IgG1 proviene dalla Chemicon, Temecula, CA, USA mentre i Blocking antibodies contro Fas e FasL sono stati forniti dalla Alexis Biochemicals, (Lausen, Switzerland).

IV METODI

4.1. Colture cellulari

Le linee cellulari THP-1 di leucemia mieloide acuta umana, NB4 e HL-60 di leucemia promielocitica acuta ed le cellule MV4-11 di leucemia mielomonocitica bifenotipica B. sono state coltivate in terreno RPMI-1640 (Euro Clone, CELBIO, Milano, Italia) completato con l'aggiunta di 10% di siero bovino fetale (heat-inactivated fetal calf serum) (FBS, Euro Clone, CELBIO) penicillina 100 U/mL (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc, Walkersville, USA), streptomina 100 mg/mL (Cambrex, Bio Science) ed L-glutamina 5 mM (Cambrex, Bio Science)

Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di anidride carbonica a una densità cellulare compresa fra 4×10^5 e 1×10^6 cellule/mL in fiasche da colture cellulari da 25 cm² (Corning Incorporated, New York, USA).

4.2. Saggio MTT

Il saggio MTT è un saggio colorimetrico che permette di valutare la vitalità di cellule metabolicamente attive. Si basa sulla riduzione del sale di tetrazolio (MTT) a cristalli di formazano. La reazione, in cellule metabolicamente attive, viene catalizzata dall'enzima succinato reduttasi [Berridge *et al.*, 1993] ed utilizza come cofattori NADH e NADPH.

Una volta ottenuti, i cristalli rossi di formazano sono solubilizzati e la soluzione derivante viene quantificata misurandone l'assorbanza tramite un lettore ELISA (Bio-Rad).

Le cellule sono state seminate in *multiwell* da 96 pozzetti (Nunc, Rochester, NY), alla concentrazione 25.000 cellule/pozzetto in un volume finale di 100µL ciascuno e incubate O.N. a 37°C in atmosfera umidificata per permetterne la crescita esponenziale.

Il giorno seguente le cellule THP-1 e MV4-11 sono state trattate con perifosina per 24 e 48h alle concentrazioni di 100nM, 1, 2, 5, 10, 20µM mentre le cellule THP-1, NB4 e HL-60 sono state trattate con erufosina per 24h alle concentrazioni di 5, 10, 15, 20 e 25µM In ogni esperimento è stato utilizzato un campione di cellule non trattato come controllo.

Cellule THP-1 sono state, inoltre pretattate con SP600125 10µM e con L-JNK inhibitor-1, 1, 2,5 e 5 µM 2h a 37°C per determinare il contributo di JNK all'apoptosi indotta rispettivamente da perifosina ed erufosina. Cellule THP-1 sono state, inoltre,

pretrattate con 2µg/mL di anticorpo anti-Fas o anti-Fas-L per 2h a 37°C per valutare il coinvolgimento di queste molecole nell'apoptosi indotta da perifosina.

Infine, per quanto riguarda la valutazione dell'effetto sinergico dell'erufosina su cellule THP-1, sono stati effettuati poi anche i trattamenti combinati:

- Erufosina e Mitoxantrone,
- Erufosina ed Etoposide,
- Erufosina e Doxorubicina

In particolare, sono state effettuate tre serie di esperimenti in cui i farmaci sono stati somministrati contemporaneamente, preincubando l'uno o l'altro farmaco per 2h a 37°C e successivamente trattando per 24h. I due farmaci sono stati somministrati in rapporti costanti secondo quanto descritto in letteratura.

Alla fine dei trattamenti, sono stati aggiunti 10 µL/campione di MTT labeling reagent 1x e le cellule sono state incubate 4h a 37°C, in atmosfera umidificata per permettere la formazione dei cristalli di formazano da parte delle cellule metabolicamente attive. Trascorse le 4 ore di incubazione, le cellule vengono solubilizzate aggiungendo 100 µL/campione di Solubilization Reagent (Reagente 2) e incubate O.N. a 37°C atmosfera umidificata al 5% di anidride carbonica. L'attività metabolica è stata valutata mediante lettura allo spettrofotometro ELISA Reader (Bio-Rad) della densità ottica (OD) alla lunghezza d'onda di 575 nm. Ogni campione viene allestito in triplicato e in tre esperimenti indipendenti. La frazione di cellule vitali è stata determinata attraverso il rapporto fra la densità ottica media dei campioni trattati e quella del campione di controllo non trattato.

4.3. Analisi degli effetti procurati dall'uso combinato di farmaci

Per studiare le possibili interazioni, gli effetti della combinazione tra i farmaci e una possibile sinergia tra erufosina, etoposide, doxorubicina e mitoxantrone, è stata effettuata un'analisi quantitativa secondo la teoria della relazione dose-effetto descritta da Chou e Talalay [Chou, Talalay, 1984].

Dall'equazione generale di relazione dose-effetto

$$f_a/f_u = (D/D_m)^m$$

Dove:

D rappresenta il dosaggio del farmaco in esame;

D_m (o IC_{50}) indica la concentrazione di farmaco necessaria per provocare la morte di metà della popolazione cellulare;
 f_a la frazione affetta;
 f_u la frazione non affetta;
 m un esponente che descrive l'andamento della curva.

è possibile ricavare il *combination index* (CI) e l'equazione che permette di calcolarlo.

L'equazione per il calcolo del CI, permette di determinare non solo un effetto additivo fra due o più farmaci, ma anche una sinergia o antagonismo.

Posto che i due farmaci hanno un simile o identico meccanismo d'azione avremo che il

$$CI = (D)_1/(Dx)_1 + (D)_2/(Dx)_2$$

Dove $(Dx)_1$ e $(Dx)_2$ sono le dosi dei due farmaci presi singolarmente tali da determinare la frazione affetta x_1 e x_2 .

Questo metodo di analisi generalmente fissa i valori di CI compresi tra 0.3 e 0.1 come sinergismo, i valori di $CI < 0.3$ come forte sinergismo, mentre valori di *combination index* maggiori di 1.1 sono utilizzati per indicare antagonismo.

Per calcolare il CI tra i farmaci nei vari trattamenti combinati è stato utilizzato il programma Calculusyn Biosoft Inhibit Synergy.

4.4. Risultati Statistici

Sui risultati ottenuti dal test di vitalità cellulare è stata, inoltre, eseguita un'analisi statistica per valutarne la significatività. I dati sono stati, infatti, statisticamente analizzati con un test di Dunnett dopo ANOVA (un'analisi di varianza calcolata con il software GRAPH PAD PRISM) con una significatività pari a $P < 0.05$ rispetto al controllo. I dati mostrati rappresentano la media \pm la deviazione standard (SD).

4.5. Analisi del ciclo cellulare in cellule THP-1

Sono stati analizzati gli effetti sul ciclo cellulare di cellule THP-1 sia del trattamento con perifosina che con erufosina.

Cellule THP-1 sono state trattate, infatti, con 5 μ M di perifosina per 1h, 3h e 6h, e con 10 μ M erufosina per 30', 1h, 3h, 6h e 16h.

Le cellule sono state seminate ad una densità di 500.000 cellule/mL in *multiwell* da 6 pozzetti e incubate O.N. in atmosfera umidificata a 37°C per permettere la crescita esponenziale. Il giorno successivo le cellule sono state trattate con erufosina alle concentrazioni e per i tempi sopraindicati. Come controllo è stato utilizzato un campione di cellule non trattato.

Al termine dei tempi di trattamento, sono state raccolte 500.000 cellule/mL e centrifugate a 1000 rotazioni al minuto (r.p.m) per 8 minuti. Il pellet è stato risospeso in 1 ml di PBS freddo ed è stato nuovamente centrifugato a 1000 r.p.m per 8 minuti. Successivamente, il pellet è stato trattato con 1 mL di etanolo 70% freddo per fissare le cellule e permeabilizzarle così da permettere allo Ioduro di Propidio (PI) di entrare nelle cellule e legare il DNA. I campioni sono stati conservati a 4°C per tutta la notte. Il giorno dopo sono stati centrifugati a 1000 r.p.m per 8 minuti a 4°C, il pellet è stato risospeso in 1 mL/campione di PBS freddo e nuovamente centrifugato alla stessa velocità. Scartato il surnatante, il pellet è stato risospeso in una soluzione contenente ioduro di propidio (PI) alla concentrazione finale di 50 μ g/mL. Dopo un'incubazione con ioduro di propidio per almeno 30 minuti al buio, si è proceduti all'analisi del ciclo cellulare per determinare il contenuto di DNA, mediante un citofluorimetro a flusso (CoulterEpics XL/XL-MCL) supportato da un opportuno software (Beckman Coulter Immunology).

4.6. Determinazione dell'apoptosi cellulare

L'apoptosi è stata determinata tramite colorazione con Annessina V-FITC e Ioduro di Propidio. Questa colorazione si basa sull'osservazione che subito dopo l'inizio dell'apoptosi, molti tipi cellulari traslocano la fosfatidilserina (PS) dalla faccia interna della membrana cellulare alla superficie. Una volta esposta, la fosfatidilserina può essere facilmente rivelata per colorazione con un coniugato fluorescente dell'Annessina V, una proteina con alta affinità di legame per la fosfatidilserina e i lipidi di membrana.

E' stata effettuata una doppia colorazione con PI che, intercalandosi nel DNA, è in grado di discriminare i diversi tipi cellulari. In questo caso, infatti, le cellule non vengono permeabilizzate e l'ingresso del PI all'interno della cellula è possibile solo in presenza di danni necrotici alla membrana. L'Annessina V coniugata al FITC emette fluorescenza nel verde, mentre le cellule colorate con PI emettono fluorescenza nel rosso. Il citometro a flusso discrimina le cellule vive, negative all'Annessina V e al propidio, le cellule apoptotiche precoci, positive all'Annessina V, ma non al PI e quelle in necrosi post-apoptotica, positive ad entrambe le sostanze. Sono state seminate 500.000 cellule/mL in fiasche da 25cm² e incubate 24h in ambiente umidificato a 37°C per permetterne la crescita esponenziale. Il giorno seguente sono state trattate con erufosina alle concentrazioni di 3, 5, 10 e 20 µM o con perifosina 5µM e incubate 24h a 37°C. E' stato utilizzato come controllo un campione di cellule non trattato.

Le cellule sono state, quindi, raccolte e centrifugate 8' a 1000 r.p.m. Il pellet è stato risospeso in terreno fresco e è stata eseguita una conta vitale attraverso una colorazione con Trypan Blue (SIGMA-Aldrich Corporation) che si lega, intercalandosi al DNA, alle cellule necrotiche. Sono state prelevate 1x10⁶ cellule/campione e centrifugate 5' a 1200 r.p.m. Il pellet, una volta eliminato il surnatante, è stato lavato in PBS, attraverso centrifugazione a 1200 r.p.m per 5'. Il pellet è stato risospeso in 1mL di Binding Buffer 1x. L'esperimento è stato condotto con il Kit Human Annexin V FITC della Bender MedSystems seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Sono stati aggiunti 8µL/campione di Annessina V FITC e si è incubato 15' a temperatura ambiente al buio. Successivamente le cellule sono state centrifugate 5' a 1200 r.p.m. e risospese in 450µL di Binding Buffer 1x. Sono stati aggiunti 5 µg/mL di PI in ogni campione.

La fluorescenza che risulta dal FITC e dal PI viene misurata rispettivamente a 530 e a 620 nm.

I campioni sono stati, quindi, analizzati al citofluorimetro (EPICS XL).

4.7. Preparazione dei lisati cellulari

Cellule THP-1 sono state seminate in RPMI terreno completo a una concentrazione iniziale di 5 x 10⁵ cellule/mL e incubate O.N. a 37°C in atmosfera umidificata per permettere la crescita esponenziale. Sono state poi trattate con perifosina alla concentrazione finale di 100nM, 1, 2, 5 10 e 20µM o con erufosina alle

concentrazioni di: 3, 5, 10, 20 μM e incubate 24h a 37°C o secondo quanto diversamente specificato. E' stato utilizzato come controllo un campione di cellule non trattato.

Il giorno seguente sono state raccolte le cellule per centrifugazione 8' a 1000 r.p.m. e il pellet risospeso in PBS1x. Le cellule sono state quindi lavate dall'eccesso di terreno per centrifugazione a 1200 r.p.m. per 5'. Una volta eliminato il surnatante, il pellet cellulare è stato risospeso in 150-200 μL di M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce Biotechnology) addizionato con 200mM di Na_3VO_4 (Sigma-Aldrich Corporation) e con 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ di inibitori delle proteasi (Protease Inhibitor Cocktail Roche Applied Science, Penzberg, Germany) e successivamente lisato in ghiaccio per 30'. I detriti cellulari sono stati eliminati per centrifugazione a 13200 r.p.m. per 20' a 4°C. Si è raccolto quindi il sovrnatante contenente proteine.

La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Bradford; tale metodo sfrutta l'affinità di legame del Coomassie Brilliant Blue G-250 alle proteine. Il colorante esiste in tre forme: cationica di colore rosso, neutra di colore verde e anionica di colore blu. In ambiente acido, il Coomassie si trova prevalentemente nella forma rossa protonata, ma in presenza di una soluzione proteica è in grado di legarsi alle proteine, attraverso interazioni con residui basici (principalmente arginina) e aromatici e di convertirsi nella forma anionica più stabile di colore blu, la cui assorbanza può essere misurata alla lunghezza d'onda di 595 nm. Per la costruzione della retta di taratura è stata utilizzata come standard di riferimento la BSA (Bovin Serum Albumin SIGMA-Aldrich Corporation). I campioni sono stati allestiti in triplicato e la lettura è stata eseguita allo spettrofotometro (Beckman Coulter DU730) alla lunghezza d'onda di 595 nm. La concentrazione proteica di ogni replica è stata calcolata per interpolazione dei valori di assorbanza ottenuti con la curva standard di BSA. La concentrazione proteica di ogni campione è stata quindi determinata facendo la media delle tre repliche. I campioni sono stati conservati a -80°C.

4.8. Western blotting

L'elettroforesi per la separazione delle proteine è stata effettuata su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti, ovvero in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE). La tecnica dell'SDS-PAGE permette di separare le proteine in funzione del loro peso molecolare. L'SDS (sodiododecil solfato) è un detergente anionico che denatura le proteine riportandole alla loro struttura primaria, distruggendo i ponti disolfuro che ne caratterizzano la struttura secondaria e terziaria e conferendo alle proteine una carica negativa uniforme. Come risultato, le proteine saranno tutte egualmente ed uniformemente cariche e potranno perciò migrare verso il polo positivo solo in funzione del loro peso molecolare se poste in un campo elettrico. La poliacrilamide è un polimero costituito da monomeri di acrilammide in grado di solidificare in presenza di catalizzatori. Il gel si presenta perciò come un reticolato di porosità a diametro variabile a seconda della diversa percentuale di acrilammide utilizzata, in cui le molecole piccole si muoveranno più rapidamente delle molecole più grosse.

Ogni gel è stato preparato in due parti:

- un RUNNING GEL, preparato con 10-15% acrilammide/bis-acrilammide (soluzione stock 30% Sigma-Aldrich), 0.375 M Tris (soluzione stock 1.5 M), pH 8.8, 1% SDS (soluzione stock 10%, Fluka BioChemika, Svizzera), 1% ammonio persolfato (APS) (soluzione stock 10%, Sigma-Aldrich) e 0.1% TEMED (Amersham Biosciences UK Limited, Bucks, UK) e 0.1% di H₂O;
- uno STACKING GEL, su cui vengono caricati i campioni, preparato con 4% acrilammide/bis-acrilammide (soluzione stock 30%), 0.125 M Tris (soluzione stock 0.5 M), pH 6.8, 1% SDS (soluzione stock 10%), 1% ammonio persolfato (APS) (soluzione stock 10%) e 0.1% TEMED. e 0.1% H₂O.

La separazione proteica è stata effettuata in cassette da elettroforesi (Amersham Biosciences UK Limited, Bucks, UK) alimentate da una corrente elettrica che permette la migrazione delle proteine verso l'elettrodo di carica opposta alla propria, che è negativa.

E' stato caricato in ogni pozzetto un uguale quantitativo di proteine (60-80 µg), denaturato al calore per 5' a 95°C e colorato con blu di bromofenolo (Sigma-Aldrich Corporation) più uno standard dei pesi molecolari (Bio-Rad) per seguire la migrazione durante la corsa.

L'omogenato totale è stato, quindi, separato su SDS-PAGE (in gel al 10-15% di acrilamide) a 100 V costanti in presenza di RUNNING BUFFER composto da SDS

1%, 25 mM Tris, 200 mM glicina e acqua distillata. Nel momento in cui il fronte di corsa ha raggiunto il limite inferiore del gel, è stata interrotta la corsa e le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Ge-Healthcare, UK Limited) attraverso un Semidry Transblotter (Sigma-Aldrich Corporation), utilizzando un TRANSBLOTTING BUFFER, una soluzione acquosa contenente: 10% metanolo (Merck, Darmstadt, Germany), 50mM Tris e 200mM glicina.

Il trasferimento delle proteine dal gel di poliacrilammide alla membrana di nitrocellulosa è avvenuto blottando a 100 V, 56mA costanti per circa 2 ore e mezzo; successivamente, per accertare il corretto trasferimento, la membrana è stata colorata con il colorante Rosso Ponceau (Sigma-Aldrich Corporation), che si lega alle proteine in modo aspecifico. La membrana è stata, quindi, decolorata con TRIS 1M ed equilibrata in una soluzione contenente PBS 1x, TWEEN-20 0,1% (Sigma-Aldrich Corporation) (PBS/T). I siti di legame aspecifici sono stati bloccati con una soluzione di 5% di latte scremato (non-fat dry milk) in PBS/T per 1h a temperatura ambiente. Dopo aver effettuato 3 lavaggi in PBS-T di 10' ciascuno, le membrane vengono incubate O.N. a 4°C con gli anticorpi primari diretti contro le proteine di interesse. Gli anticorpi primari sono stati diluiti come da *data sheet* in soluzioni contenenti 5% BSA, o 5% latte in PBS/T a seconda che l'anticorpo primario fosse rispettivamente policlonale o monoclonale. La membrana è stata, quindi, lavata 3 volte per 10' in PBS/T per eliminare l'eccesso di anticorpo primario e nuovamente incubata per 1h a temperatura ambiente con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi (HRP) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA) diluito 1:2000 in 5% di latte. Al termine del periodo d'incubazione, la membrana è stata lavata 3 volte per 10' in PBS/T.

Il legame delle proteine *target* con l'anticorpo specifico è stato visualizzato attraverso luminescenza per incubazione con l'ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Buckinghamshire HP79NA, UK). In condizioni alcaline e in presenza del substrato chemiluminescente (luminolo), la HRP legata all'anticorpo secondario ne catalizza l'ossidazione. Il luminolo, eccitato, emette perciò luce in maniera direttamente proporzionale alla quantità di proteina presente. Il segnale luminoso derivante è stato infine impressionato su lastre fotografiche (Kodak) e sviluppate in camera oscura.

4.9 Immunoprecipitazione dei complessi m TORC

La tecnica dell'immunoprecipitazione sfrutta l'interazione anticorpo-antigene per precipitare antigeni specifici presenti in una soluzione (per esempio un lisato cellulare). Una volta aggiunto un anticorpo alla soluzione, infatti, questo riconoscerà e legherà il suo antigene formando complessi solubili anticorpo-antigene.

A questo punto, per isolare tali complessi si ricorre all'impiego di una proteina legante immunoglobuline, come la proteina A o G, associate covalentemente a un supporto insolubile, quale l'agarosio, che aumentando il peso molecolare dell'intero complesso consente di precipitarlo mediante centrifugazione.

L'immunoprecipitazione è stata condotta su cellule THP-1 trattate con perifosina alla concentrazione di 100nM, 2, 5 e 10µM per 24h secondo quanto descritto in letteratura [Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ, et al.. 2007].

4.10 Saggio citofluorimetrico per la determinazione dell'attività delle caspasi (FLICA assay)

Sono stati effettuati saggi citofluorimetrici per determinare l'attività delle caspasi dopo trattamento con perifosina in cellule THP-1.

La metodologia è basata sull'utilizzo del *Fluorochrome Inhibitor of Caspases* (FLICA) che, una volta all'interno della cellula dove entra in quanto permeabile alla membrana plasmatica, si lega covalentemente alle caspasi attive.

Inoltre, poiché stabilisce un legame covalente con la caspasi attiva, l'inibitore legato viene mantenuto all'interno della cellula mentre il fluoroforo non legato diffonde all'esterno ed può essere quindi lavato via.

Il segnale di fluorescenza è, quindi, direttamente proporzionale al numero di caspasi attive presenti all'interno della cellula al momento in cui è stato aggiunto l'inibitore coniugato.

I saggi sono stati condotti utilizzando il *carboxyfluorescein FLICA Apoptosis detection kit Caspase Assay* (Serotech, Oxford, UK), seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Brevemente, sono state seminate 5×10^5 cellule/mL e trattate con perifosina 10µM per 24h.

Al termine del trattamento, le cellule sono state raccolte per centrifugazione 5' a 1200 r.p.m è stata effettuata una conta vitale con trypan blue; un totale di 3×10^5

cellule/campione sono state quindi, lavate in PBS e marcate con il FLICA ed incubate 1h a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di anidride carbonica.

Successivamente le cellule sono state lavate due volte in PBS. La fluorescenza risultante è stata misurata a 488nm attraverso il citofluorimetro (EPICS XL).

Un campione di cellule non trattato con perifosina è stato colorato con FLICA per determinare la specificità di legame della molecola e usato come controllo.

4.11 Fenotipizzazione citofluorimetrica di cellule THP-1 trattate con perifosina

Cellule THP-1 sono state trattate con 5µM di perifosina per 24h allo scopo di valutare attraverso citometria a flusso l'espressione di proteine quali p-FLT3, p-Akt, p-Erk 1/2, p-JNK, Fas e Fas-L.

Sono state prelevate 500.000 cellule/campione e centrifugate 10' a 1000 r.p.m. e lavate in PBS.

Le cellule sono state quindi fissate con il Reagente 1 dell'intrapep kit (Beckman Coulter Immunology) 20' a temperatura ambiente, permeabilizzate con il Reagente 2 dello stesso kit e incubate O.N. a 4°C con l'anticorpo primario coniugato con Alexa Fluor (p-FLT3, p-Akt, p-Erk 1/2, p-JNK) diluito 1:100 in 0,5%BSA in PBS. L'espressione di p-Bad è stata invece rivelata attraverso l'utilizzo di un anticorpo secondario coniugato con FITC. Dopo l'incubazione con l'anticorpo le cellule sono state lavate in PBS ed analizzate al citofluorimetro.

La determinazione dei livelli di espressione di Fas e del suo ligando Fas-L è invece stata effettuata su campioni di cellule a fresco seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

500.000 cellule/campione sono state, infatti incubate con gli anticorpi contro Fas e Fas-L alla concentrazione finale di 10µg/mL. I campioni sono stati lavati tre volte in PBS e solo successivamente fissate con paraformaldeide 0.5% in PBS. Le cellule sono state analizzate al citofluorimetro dopo 3 lavaggi in PBS.

Sono stati analizzati circa 5000 eventi per ogni campione nelle analisi citofluorimetriche fin qui descritte.

4.12 Saggio clonogenico di cellule AML

Campioni di sangue midollare e periferico di pazienti affetti da AML e di donatori sani sono stati analizzati dopo aver ottenuto il consenso informato.

Le cellule mononucleate sono state quindi separate tramite centrifugazione su gradiente di densità utilizzando Ficoll-Paque.

I campioni sono stati diluiti 1:3 con soluzione fisiologica sterile (0,9% p/v NaCl). Sotto cappa a flusso laminare è stato disposto un numero di provette sterili da 15mL adeguato alla quantità di materiale da processare. In particolare, è stata considerata una provetta ogni 5mL di sangue diluito. In ciascuna provetta da 15 mL sono stati dispensati 3mL di Ficoll (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare). Successivamente, 5mL di campione diluito sono stati introdotti nella provetta contenente il Ficoll, evitando che il campione si mescolasse al Ficoll stesso. Il campione è poi stato centrifugato a 1900r.p.m per 20' a temperatura ambiente e senza freno. Al termine della centrifuga, all'interno della provetta, procedendo dal basso verso l'alto, si distinguono diverse fasi: globuli rossi, Ficoll, cellule mononucleate disposte ad anello e plasma.

Con una pipetta *pasteur* sterile è stato prelevato l'anello delle cellule mononucleate, aspirando con un movimento circolare lungo l'anello e trasferendo il contenuto in una nuova provetta da 15mL.

Il campione è stato poi diluito con soluzione fisiologica sterile (Fresenius Kabi, Italia) fino al raggiungimento di un volume totale di 10mL ed è poi stato centrifugato a 1800r.p.m per 10 minuti a temperatura ambiente e senza freno.

E' stato poi fatto un secondo lavaggio con le stesse modalità sopra descritte, ma questa volta centrifugando a 1600r.p.m per 10 minuti a temperatura ambiente e senza freno. Per eliminare gli eventuali globuli rossi presenti nel *pellet* è stato quindi aggiunto 1mL di acqua sterile, che è stata lasciata agire per 1minuto esatto, prima dell'aggiunta di soluzione fisiologica sterile fino a un volume totale di 10 mL. Il campione è stato poi centrifugato a 1600r.p.m per 10minuti, a temperatura ambiente e senza freno. Le cellule sono infine state risospese in PBS1x sterile e contate.

Successivamente cellule CD34⁺ sono state separate tramite separazione immunomagnetica (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Una volta separate, le cellule CD34⁺ sono state seminate ad una densità di 1000 in *multiwell* da 6 in mezzo contenente metilcellulosa (Methocult Methylcellulose medium, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) complementato con

20ng/mL di GM-CSF, IL-3 e IL-6. Le piastre sono state, quindi, incubate per 16 giorni all'interno di un incubatore in atmosfera umidificata (5% CO₂, 37°C).

Il numero di colonie è stato determinato *in situ* attraverso osservazione al microscopio ottico invertito (Olympus CKX 41).

4.13 Reverse transcriptase-PCR

L'RNA totale è stato isolato utilizzando il the RNAeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), e seguendo le indicazioni della ditta produttrice. L'RNA (2µg) è stato poi retrotrascritto utilizzando la MMLV reverse transcriptase (Stratagene, La Jolla, USA) e amplificato in un volume finale di 50µL, utilizzando 50pmol di ciascun *primer*. Fas-L *forward*: 5'-GCAGCCCTTCAATACCCAT-3'; Fas-L *reverse* 5'-CAGGGTTGGACAGGGAAGAA-3';

GAPDH *forward* 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3';

GAPDH *reverse* 5'-CATGTGGGCATGAGGTCCACCAC-3'. Le condizioni di amplificazione sono le seguenti: 2' a 50°C, 10' a 95°C seguiti da 15s a 95°C e 1min a 60°C. Per l'espressione di Fas-L sono stati condotti 50 cicli di amplificazione mentre per la GAPDH ne sono stati condotti 40.

V RISULTATI

5.1.1 La perifosina induce apoptosi e arresto del ciclo cellulare in cellule di leucemia mieloide acuta

Per determinare se il trattamento con perifosina avesse effetto sul ciclo cellulare, cellule di leucemia mieloide acuta THP-1 sono state trattate con 5 μ M di perifosina per un tempo massimo di 6h.

Dall'analisi citofluorimetrica effettuata tramite colorazione con Ioduro di Propidio, (Fig 5.1.1), è risultato, in accordo con quanto riportato in letteratura, che la somministrazione di perifosina è in grado di indurre un blocco del ciclo cellulare in fase S e G2-M

Inoltre, per valutare gli effetti sulla sopravvivenza cellulare della perifosina, su linee cellulari di AML, sono stati effettuati saggi MTT in cui cellule THP-1 e MV4-11 sono state esposte a concentrazioni crescenti di farmaco per 24 e 48h.

Come mostrato in Fig 5.1.2 (a) la perifosina causa un progressivo decremento della viabilità cellulare di cellule THP-1 con un andamento dose dipendente. Dopo 24h di trattamento l'IC₅₀ del farmaco è circa 16 μ M; dopo 48h di trattamento l'effetto apoptotico del farmaco risulta evidente anche a minore concentrazione. Le cellule MV4-11 si sono dimostrate maggiormente sensibili al farmaco, avendo un IC₅₀ dopo 24h di trattamento con perifosina intorno a 3 μ M; anche in queste cellule l'effetto del farmaco risulta maggiormente evidente dopo 48h di trattamento.

Successivamente abbiamo voluto indagare se il decremento dell'attività metabolica e della viabilità cellulare delle cellule THP-1 a seguito del trattamento con perifosina fosse dovuto ad apoptosi cellulare.

E' stata quindi effettuata un'analisi citofluorimetrica tramite colorazione biparametrica con Annessina V-FITC e PI.

Come mostrato in Fig 5.1.2 (b), dopo 24h di trattamento con 5 μ M di perifosina, il 41% delle cellule è positivo all'Annessina (cellule apoptotiche), mentre il 23% risulta doppiamente positivo ad Annessina V e PI.

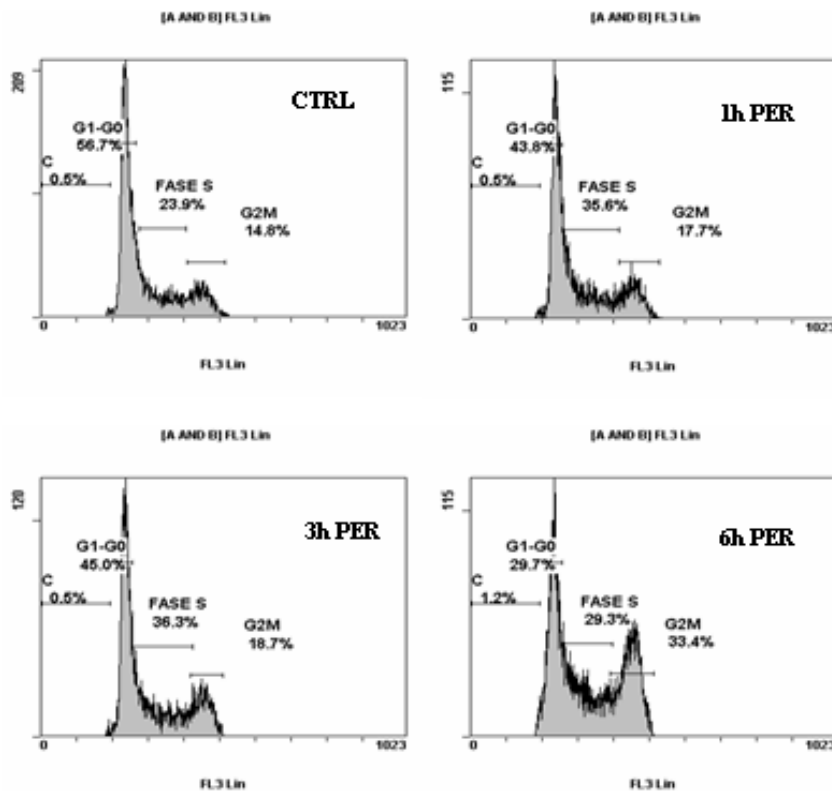


Fig. 5.1.1 La perifosina induce arresto del ciclo cellulare in fase S e G2-M. Cellule THP-1 sono state trattate con 5 μ M di perifosina per i tempi indicati. Il controllo (CTRL) è rappresentato da un campione di cellule non trattato.

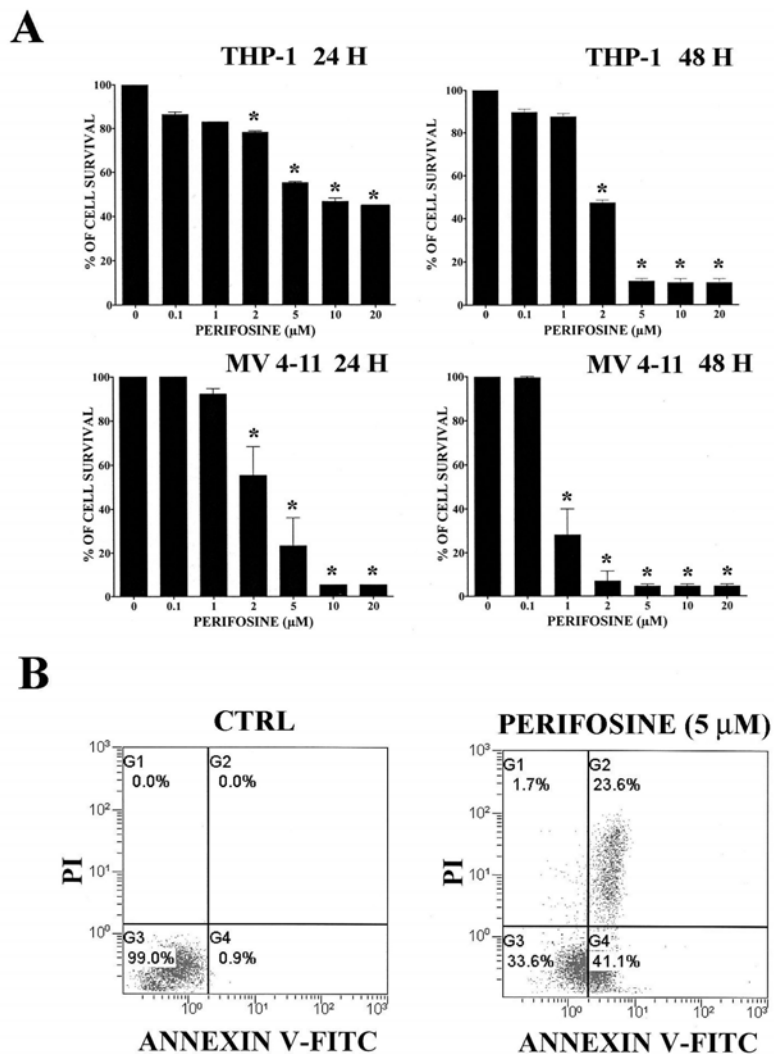


Fig. 5.1.2 La perifosina causa citotossicità ed induce apoptosi in linee cellulari di AML. (A) MTT assay di cellule THP-1 e MV4-11 trattate con concentrazioni crescenti di perifosina per 24h e 48h. (B) Colorazione con AnV-FITC/PI di cellule THP-1 trattate con perifosina per 24h.

5.1.2 La perifosina causa la diminuzione dei livelli di fosforilazione di p-Akt e p-Erk1/2 e comporta l'attivazione delle caspasi e il taglio proteolitico di PARP

E' noto che la perifosina sia un inibitore selettivo di Akt; per questo motivo è stato analizzato, attraverso analisi in *immunoblotting* l'effetto del farmaco sul *pathway* di Akt.

L'analisi in *western blot* condotta utilizzando un anticorpo contro le forme fosforilate di Akt ha, infatti, dimostrato che il trattamento con perifosina induce una diminuzione dei livelli di fosforilazione di Akt su entrambi i residui. In particolare dopo 24h di trattamento ad una concentrazione di 1µM di perifosina, la Serina473 è completamente defosforilata (Fig 5.1.3). Parimenti ad una concentrazione di 100nM la treonina308 risulta completamente defosforilata; tuttavia il trattamento anche a concentrazioni maggiori di perifosina non ha alcun effetto sui livelli di espressione della proteina totale.

L'inibizione selettiva di Akt ha importanti effetti funzionali anche su sui bersagli a valle. L'analisi in *western blot*, ha, infatti, dimostrato che il trattamento con perifosina induce una diminuzione dei livelli di fosforilazione di un importante *target* di Akt, la p70S6K, il cui residuo di Treonina389 risulta defosforilato ad una concentrazione di 10µM di perifosina dopo 24h di trattamento.

Infine, la stessa analisi condotta in *western blot*, ha dimostrato la diminuzione dei livelli di fosforilazione di Erk1/2 sulla Thr202/Tyr204 che risulta evidente ad una concentrazione di perifosina pari a 1µM.

Le caspasi sono un gruppo di proteasi di cui è stato ampiamente dimostrato il coinvolgimento ed il ruolo fondamentale nel processo apoptotico [Das H, Koizumi T, et al. 2000].

L'analisi condotta in *immunoblotting* ha dimostrato che il frammento proteolitico attivo della Caspasi apicale 8 è evidente ad una concentrazione di perifosina pari ad 1µM dopo 24h di trattamento; la presenza del frammento attivo della Caspasi-2 e la diminuzione dei livelli di espressione della pro-caspasi 9 si evidenziano, invece, ad una concentrazione di 2µM.

La stessa analisi ha, infine, dimostrato la diminuzione dei livelli di espressione delle pro-caspasi 6 e 7 e l'attivazione della caspasi effettrice 3.

Questa attivazione comporta, inoltre, la attivazione di PARP e Bid.

L'attivazione delle caspasi è stata confermata attraverso analisi citofluorimetrica di campioni marcati con FLICA. La tecnica ha, infatti confermato l'attivazione delle caspasi 8, 9 e 3/7 dopo trattamento con perifosina 5µM per 24h.

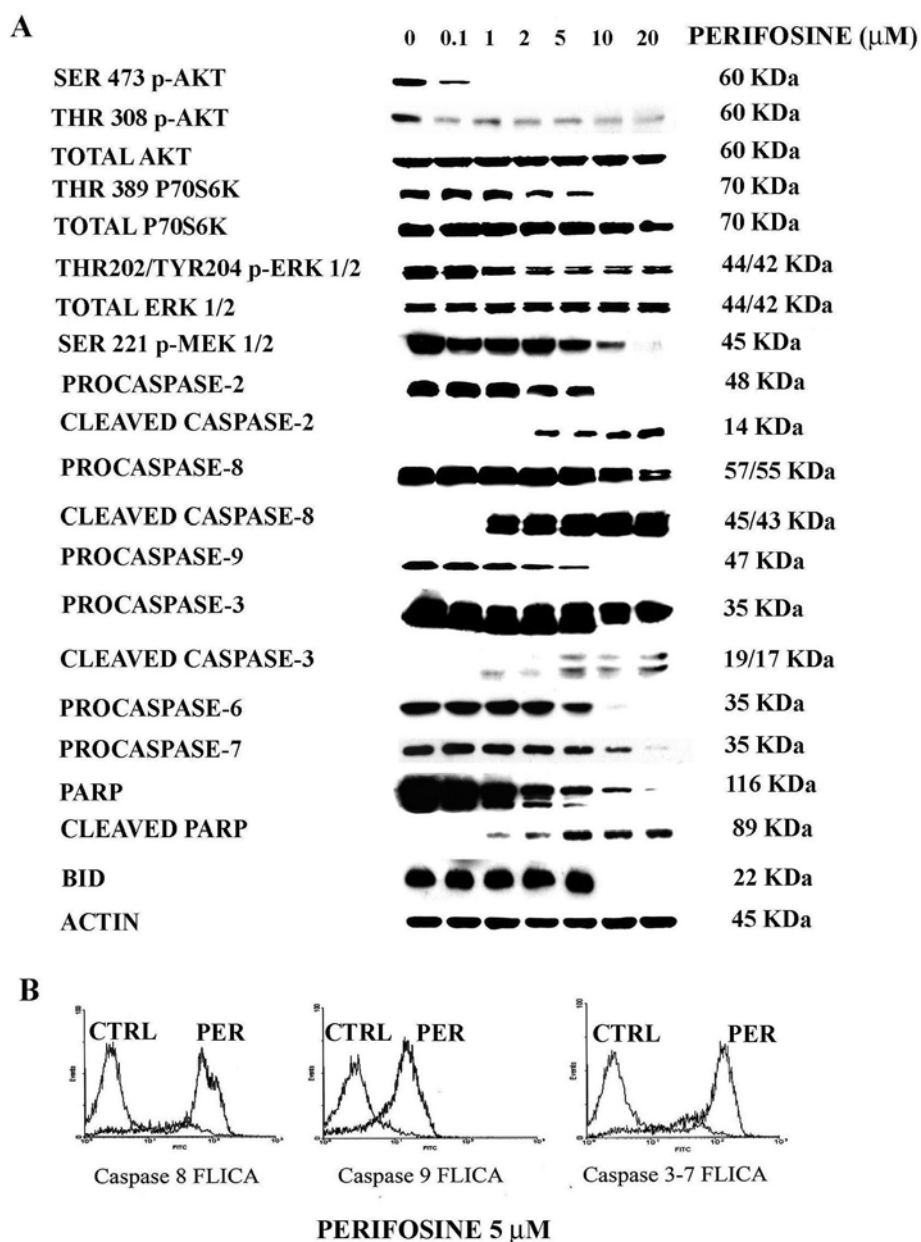


Fig. 5.1.3 Il trattamento con perifosina induce la defosforilazione di Akt e di Erk1/2 e l'attivazione delle caspasi, di PARP e di Bid. (A) *immunoblotting* di cellule THP-1 trattate con perifosina per 24h alle concentrazioni indicate. (B) determinazione dell'attivazione delle caspasi mediante FLICA assay.

5.1.3 In cellule THP-1, il trattamento con perifosina non ha effetto sui livelli di espressione di PDK-1 e sul complesso m TORC1/m TORC2

A tutt'oggi l'esatto meccanismo di azione della perifosina non è ancora chiaro; un possibile meccanismo proposto riguarda la capacità che la molecola avrebbe di interferire con il dominio PH di Akt impedendone così il reclutamento alla membrana plasmatica e la successiva attivazione [Kondapaka et al., 2003]. Abbiamo voluto perciò indagare il possibile effetto del trattamento con perifosina su PDK-1, la chinasi che fosforila Akt sulla Thr308.

E' noto dalla letteratura che la fosforilazione di PDK-1 sulla Ser241 sia essenziale affinché questa possa svolgere, a sua volta, la sua funzione chinastica [Casamayor A, Morrice NA, Alessi DR. 1999].

I nostri dati, in accordo con quanto riportato da altri [Kondapaka et al., 2003], [Nyåker et al., 2006], hanno dimostrato che il trattamento con perifosina non influenza i livelli di fosforilazione di PDK-1; abbiamo, inoltre, dimostrato che lo stesso trattamento non induce variazione dei livelli di espressione di p-PAK Thr423, un bersaglio a valle di PDK-1 (Fig. 5.1.4 (a)). Inoltre, poiché la perifosina comporta la defosforilazione di Akt anche sulla Ser473, abbiamo voluto indagare se il trattamento fosse in grado di alterare in qualche modo l'equilibrio tra il complesso m TORC1 (formato da m TOR, Raptor e mLST8) e il complesso m TORC2 (costituito da m TOR, Rictor e mLST8) che recentemente è stato proposto come chinasi responsabile della fosforilazione di Akt sulla Ser473 a livello dell'estremità N-terminale [Recher C, Dos Santos 2005]. Dalle analisi condotte tramite immunoprecipitazione, i cui risultati sono mostrati in Figura 5.1.4 (b), il trattamento con perifosina non interferisce con la formazione di entrambi i complessi sopra citati, né con l'espressione dei singoli componenti.

Infine per determinare il peso relativo all'apoptosi indotta da perifosina della modulazione dei *pathways* di trasduzione del segnale della PI3K/Akt e di Mek/Erk, cellule THP-1 sono state trattate con LY294002, un inibitore della PI3K, e con il PD98059, un inibitore di Mek. Come mostrato in Figura 5.1.4 (c), a seguito del trattamento con LY294002, è visibile in *western blot* una modulazione dei livelli di fosforilazione di Akt su entrambi i residui, mentre il trattamento con PD98059 lascia l'espressione di p-Erk1/2 sostanzialmente invariata. Inoltre dal saggio MTT parallelamente condotto, è emerso che la regolazione dei livelli di fosforilazione di Akt, a seguito del trattamento con LY294002, determina una diminuzione della vitalità cellulare di circa il 40%, viceversa una modulazione dei livelli di fosforilazione

di p-Erk1/2, paragonabile a quella che si ha a seguito del trattamento con perifosina, causa un decremento della vitalità cellulare di quasi il 20%. Nel loro insieme, quindi, questi risultati dimostrano chiaramente che in cellule THP-1, l'inibizione della via di segnalazione della PI3K/Akt dovuta al trattamento con perifosina ha un contributo nettamente maggiore all'apoptosi cellulare rispetto alla parziale inibizione del *pathway* di MEK/Erk1/2.

5.1.4 La perifosina causa, in cellule THP-1 la defosforilazione di Bad

Da recenti lavori, [Zhao S, Konopleva M, 2004] è emerso che la fosforilazione della proteina Bad svolge un ruolo importante nella sopravvivenza di cellule leucemiche. Attraverso analisi citofluorimetriche abbiamo voluto, perciò, investigare se la perifosina fosse in grado di defosforilare Bad a livello della Ser112 un residuo bersaglio di Erk1/2, (la Serina in posizione 136 lo è, invece della via di segnalazione della PI3K/Akt).

Come controllo positivo sono state utilizzate cellule di leucemia-T Jurkat stimulate con esteri del forbolo (PMA), secondo quanto descritto in letteratura. Infatti, se non stimulate, le Jurkat non presentano livelli di espressione di p-Erk1/2 che invece, viene fortemente attivato a seguito del trattamento con PMA [Tazzari PL, Cappellini A, Ricci F, et al., 2004]. L'analisi in citofluorimetria ha dimostrato, come atteso, che in cellule Jurkat, a seguito della stimolazione con PMA si ha un aumento dei livelli di espressione di Bad fosforilato sulla Ser112; la stessa analisi ha, inoltre, dimostrato che cellule THP-1 non trattate sono altrettanto positive, mentre a seguito del trattamento con perifosina è possibile registrare un deciso calo dei livelli di fosforilazione di Bad a livello dello stesso residuo.

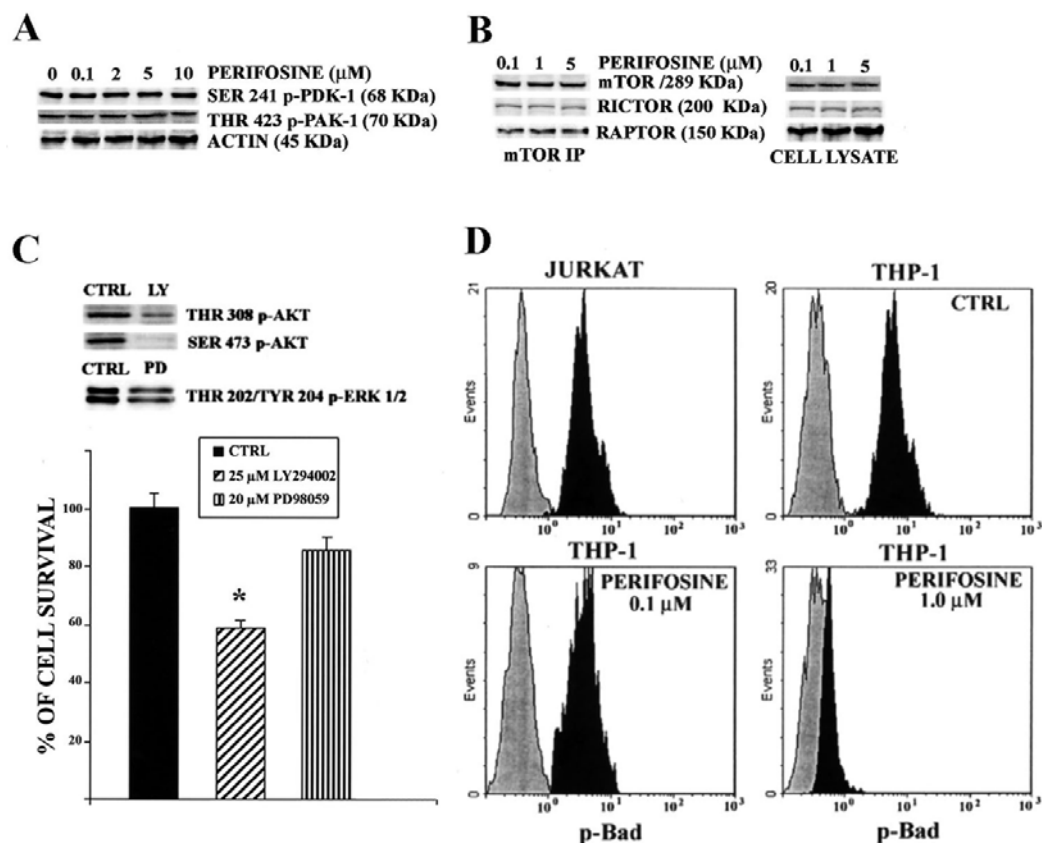


Fig. 5.1.4 Il trattamento con perifosina non ha effetto sui livelli di fosforilazione di PDK-1 e di PAK o sulla formazione dei complessi m TORC1/2 (A e B), ma è in grado di ridurre in maniera significativa i livelli di espressione di p-Bad (D).

(C) determinazione in *western blot* e attraverso saggio MTT del contributo relativo dei *pathways* della PI3K/Akt e di Mek/Erk all'apoptosi indotta da perifosina in cellule THP-1. Le cellule sono state trattate per 24h con 25 μ M di LY294002 o con 20 μ M di PD98059.

5.1.5 L'apoptosi indotta da perifosina è mediata, in cellule THP-1, da Fas, Fas-L e da JNK

Precedenti risultati ottenuti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che in cellule Jurkat, la perifosina è in grado di indurre apoptosi attraverso attivazione del sistema Fas/Fas-L [Nyâkern et al., 2006].

Abbiamo perciò voluto verificare se lo stesso meccanismo d'azione fosse ipotizzabile anche in cellule THP-1.

Cellule in fase di crescita esponenziale sono state trattate con perifosina (5 μ M) in presenza o assenza di 2 μ g/mL di anticorpi monoclonali bloccanti Fas o Fas-L. Successivamente è stato effettuato un saggio MTT dal quale è emerso che entrambi gli anticorpi sono in grado di revertire l'apoptosi indotta da perifosina (Fig. 5.1.5(a)). La successiva colorazione citofluorimetrica ha, inoltre, dimostrato che i livelli di espressione di Fas-L aumentano in risposta al trattamento con 5 μ M di perifosina per 24h. La stessa attivazione è stata dimostrata anche tramite RT-PCR (Fig. 5.1.5(b)).

Poiché, inoltre, è stato dimostrato che la citotossicità della perifosina in cellule di mieloma multiplo (MM) [Hideshima, T., J. E. Bradner, et al., 2006] può essere mediata anche attraverso l'attivazione di JNK [Hideshima, T., J. E. Bradner, et al., 2006], abbiamo condotto le stesse analisi per verificare l'attivazione di JNK a seguito del trattamento con perifosina anche in cellule THP-1. Come controllo sono state utilizzate cellule THP-1 trattate con anisomicina secondo quanto descritto in letteratura [Lee SY, Cherla RP, Tesh VL., 2007].

Come mostrato in Fig. 5.1.5(c) e Fig. 5.1.5(d), il trattamento con perifosina (5 μ M) induce un incremento dei livelli di fosforilazione di JNK; la specificità dell'azione di JNK è stata dimostrata attraverso MTT:prettrattando, infatti, le cellule con 10 μ M di SP600125 e trattandole successivamente con 5 μ M di perifosina per 24h, è possibile rilevare una diminuzione della citotossicità indotta da perifosina.

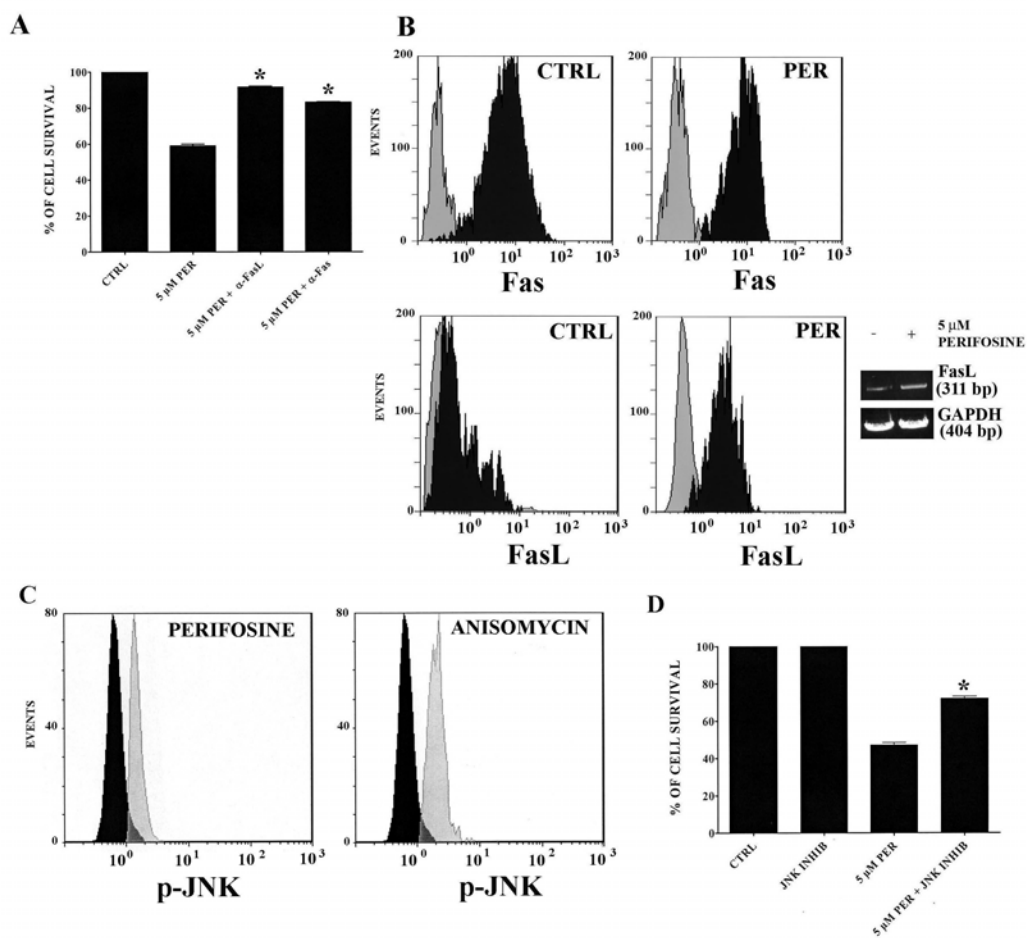


Fig. 5.1.5 L'apoptosi indotta da perifosina in cellule THP-1 è dipendente dalla attivazione di Fas/Fas-L e di JNK.

5.1.6 La perifosina modifica i livelli di espressione di p-Akt, ma non di p-FLT3 in cellule di leucemia mieloide MV4-11

Circa il 30% dei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta presentano duplicazioni duplicazioni di sequenze ripetute in tandem (ITD) a livello del dominio giustapposto alla membrana plasmatica di FLT3. Questa mutazione comporta una variazione funzionale del recettore la cui attivazione per dimerizzazione è, in questo caso, indipendente dal legame con il ligando. L'attivazione costitutiva del recettore che ne deriva porta ad un'iperattivazione delle vie di traduzione del segnale che da esso si generano, tra cui quella della PI3K/Akt [Kappelmayer J, 2007].

Allo scopo quindi di testare la specificità di azione della perifosina, cellule MV4-11 leucemia mielomonocitica bifenotipica B, caratterizzate da una ITD a livello di FLT3 [Yee KW, 2002] sono state, pertanto, trattate con il farmaco e fenotipizzate attraverso analisi in citometria a flusso per i livelli p-Akt e p-FLT3 (Fig 5.1.6). Come controllo negativo sono state utilizzate cellule HL-60.

A seguito del trattamento con perifosina (2 μ M per 24h), è possibile notare una diminuzione dei livelli di fosforilazione di Akt, ma non di FLT3.

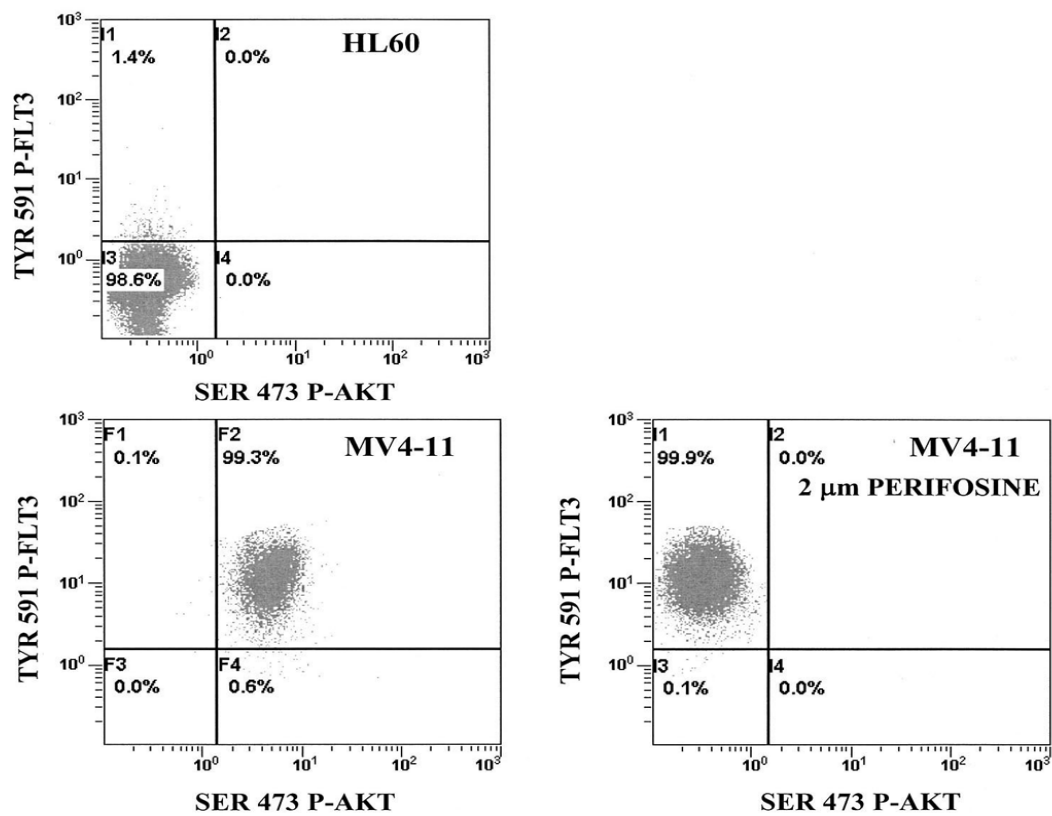


Fig. 5.1.6 Il trattamento con perifosina in cellule MV4-11 è in grado di influenzare negativamente i livelli di espressione di p-Akt, ma non quelli di p-FLT3.

5.1.7 Il trattamento con perifosina regola negativamente la sopravvivenza cellulare di blasti di pazienti affetti da AML

Data la scarsa presenza in letteratura di dati che determinassero gli effetti della perifosina su cellule primarie di AML, abbiamo voluto studiare 7 pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (il quadro clinico dei pazienti è riassunto in Tabella 1), caratterizzandoli mediante citofluorimetria per l'espressione di p-Akt e p-Erk1/2 [Tazzari PL, Cappellini A, Ricci F, et al., 2004]. Dall'analisi condotta è risultato che 3 pazienti sono negativi per p-Akt, ma mostrano elevati livelli di fosforilazione di p-Erk; viceversa 4 dei 7 pazienti analizzati hanno mostrato elevati livelli di fosforilazione di Akt sulla Ser473, e bassi livelli di fosforilazione di p-Erk1/2; trattando i blasti dei pazienti recanti bassi livelli di fosforilazione di Akt con 5 μ M di perifosina, si è potuto osservare una significativa differenza nella sopravvivenza cellulare rispetto al controllo, mentre una marcata diminuzione della sopravvivenza cellulare è stata riscontrata trattando i blasti dei pazienti recanti alti livelli di p-Akt Ser473 con concentrazioni di perifosina inferiori (2 μ M) (Fig 5.1.7 a e b); in questi pazienti, inoltre, il trattamento con 10 μ M di perifosina determina una diminuzione della sopravvivenza cellulare pari a circa il 70% contro un 40% riscontrabile in pazienti che non mostrano elevati livelli di attivazione di Akt. Il saggio MTT ha, inoltre dimostrato che l'IC50 della perifosina in blasti di pazienti che non hanno elevati livelli di espressione di p-Akt si aggira tra il 16.7 e il 18.9 μ M, mentre in pazienti p-Akt positivi, questo è significativamente più basso (5.6-7.4 μ M).

	Sex	Age	FAB	p-Akt levels	p-ERK 1/2 levels	Source of blasts
1	F	66	M1	-	++++	PBL
2	M	58	M4	-	++++	PBL
3	F	69	M0	-	+++	BM
4	M	45	M2	++++	+	BM
5	F	63	-M4	++		PBL
6	F	50	M0	+++	++	BM
7	M	50	M1	+++	-	BM

Tabella 5.1 Caratteristiche dei pazienti AML studiati e loro stato di fosforilazione per p-Akt e p-Erk1/2. BM, bone marrow; PBL, peripheral blood.

I livelli di fosforilazione sono stati settati paragonandoli a quelli di cellule jurkat, usate come controllo positivo per p-Akt e cellule Jurkat stimulate con PMA per p-Erk1/2.

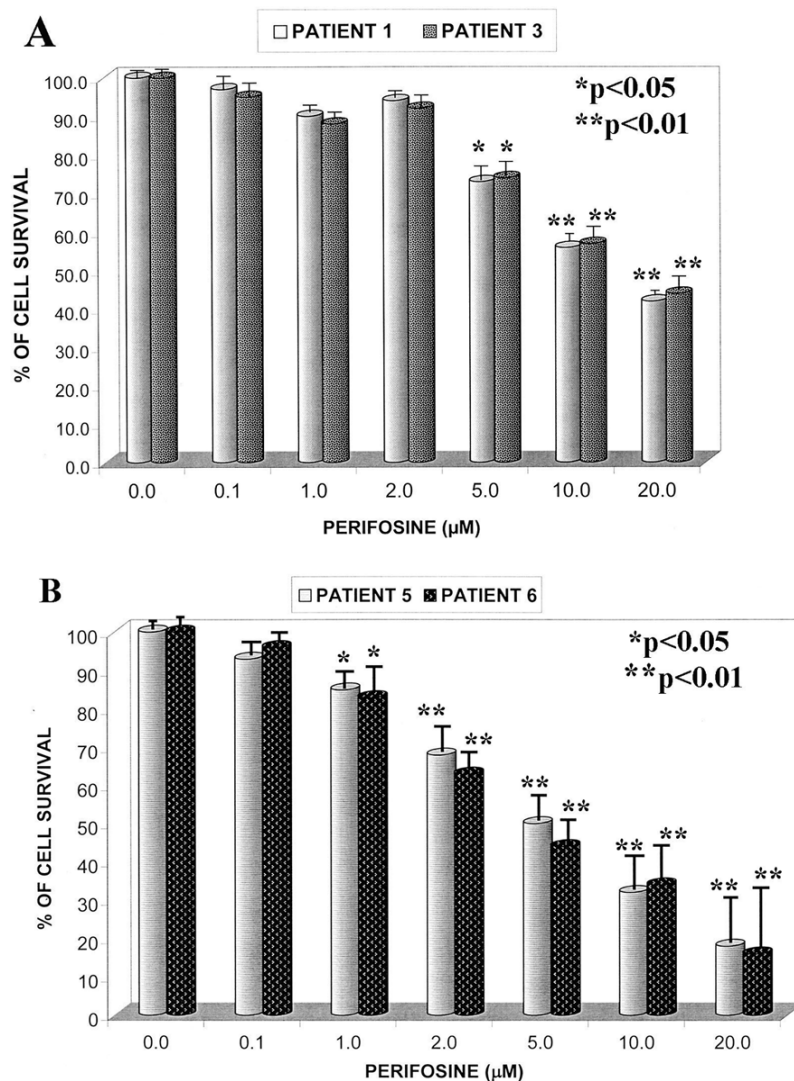


Fig. 5.1.7 Il trattamento con perifosina induce una diminuzione della sopravvivenza cellulare di blasti affetti da AML. (A) Saggio MTT condotto su blasti di pazienti senza attivazione di Akt. (B) Saggio MTT condotto su blasti di pazienti con alti livelli di espressione di p-Akt.

5.1.8 Effetti della perifosina sulla capacità clonogenica di cellule CD34⁺ isolate da pazienti affetti da AML e da donatori sani

La capacità clonogenica di cellule CD34⁺ isolate da pazienti affetti da AML e da donatori sani è stata saggiata aggiungendo 2µM di perifosina al mezzo semisolido di metilcellulosa. Il trattamento con perifosina ha causato una significativa diminuzione della capacità clonogenica dei progenitori CD34⁺ provenienti da pazienti con attivazione, ma non ha influenzato significativamente la capacità clonogenica di donatori sani né di pazienti con bassi livelli di fosforilazione di p-Akt (Fig.5.1.8 (a)).

Infine è stata valutata attraverso saggio MTT la capacità della perifosina di sinergizzare con agenti chemioterapici convenzionali quali l'etoposide in blasti AML. Come mostrato in Fig 5.1.8 (b), La capacità della perifosina di indurre una diminuzione della sopravvivenza dei blasti (casi 4-7) aumenta fortemente in concomitanza del trattamento con 500nM di etoposide che da solo non è tuttavia in grado di produrre alcun effetto.

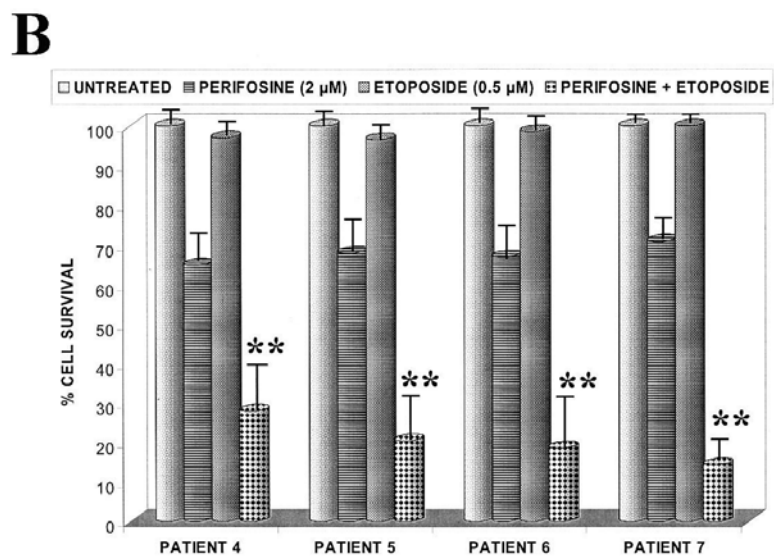
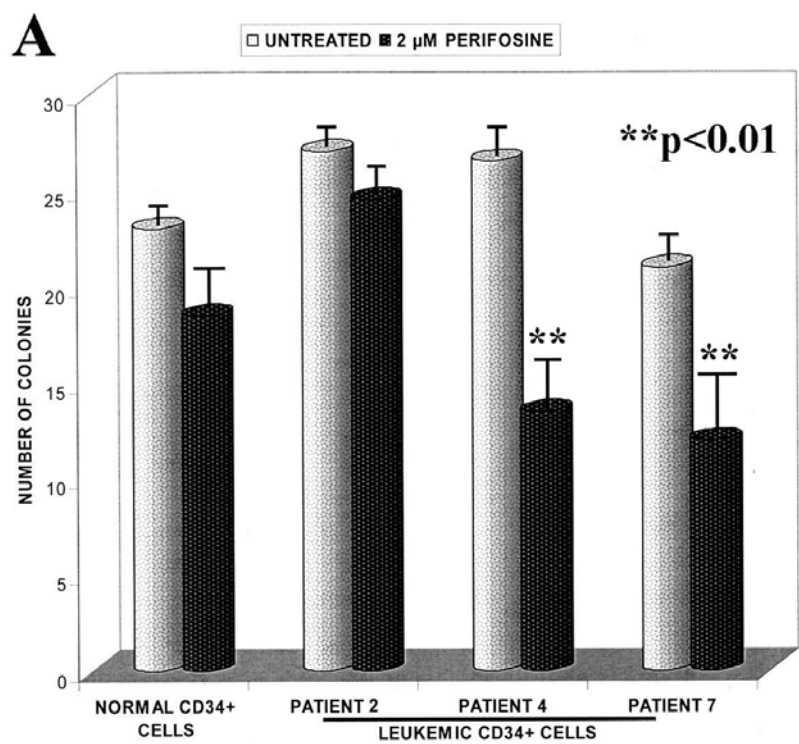


Fig 5.1.8 Saggio clonogenico di cellule CD34⁺.

5.2.1 L'ErPC3 influenza negativamente la sopravvivenza cellulare e induce apoptosi e blocco del ciclo cellulare in linee cellulari di AML

Nonostante la sua buona distribuzione tissutale, il trattamento con perifosina è, però, limitato da una tossicità dose-dipendente soprattutto a livello gastro-intestinale a seguito della somministrazione orale del farmaco. Allo scopo, quindi, di ridurre gli spiacevoli effetti collaterali legati alla somministrazione orale del farmaco, sono stati sviluppati nuovi chemioterapici di sintesi tra cui le alchilfosfocoline (APC), una nuova classe di farmaci citostatici di cui fa parte l'erufosina (ErPC3) che, a differenza dei precedenti alchilfosfolipidi possono essere somministrati per via intravenosa in quanto non causano emolisi e possono essere utilizzate nell'uomo a concentrazioni plasmatiche più elevate avendo meno effetti collaterali.

Gli effetti dell' ErPC3 sul ciclo cellulare, sono stati analizzati analogamente a quanto fatto per la perifosina, su cellule di leucemia mieloide THP-1; queste sono state quindi esposte ad una concentrazione di sono state esposte ad una concentrazione di erufosina pari a 10mM per diversi tempi (30', 1 h, 3 h, 6 h e 16 h). L'incubazione con PI per 30 minuti al buio, ha successivamente permesso l'analisi del ciclo cellulare per determinare il contenuto di DNA.

Come mostrato in Fig. 5.2.1(a) l'analisi citofluorimetrica di cellule THP-1 colorate con PI documenta un incremento della percentuale di cellule ferme in fase G2-M del ciclo cellulare con un andamento dose dipendente; dopo 16 ore di trattamento, alla concentrazione di 10µM si osserva, infatti, un arresto in fase G2-M del ciclo cellulare con un aumento dal 14 al 28%. Questo permette di dedurre che l'ErPC3, somministrata in cellule THP-1, mostra un' attività antiproliferativa dose-dipendente e un'attività proapoptotica. Tale dato è stato poi confermato tramite colorazione con AnV-FITC/PI e successiva analisi citofluorimetrica. Dalla Fig. 5.2.1 (b), si può notare infatti, come il trattamento con concentrazioni crescenti di ErPC3 per 24h determini un aumento della percentuale di cellule positive all'Annexina e/o al PI con un andamento dose dipendente. Infine, per valutare gli effetti dell' ErPC3 sulla sopravvivenza cellulare di linee cellulari di AML, cellule THP-1, NB4 e HL-60 di leucemia promielocitica acuta sono state trattate con erufosina per 24h alle concentrazioni di 5, 10, 15, 20 e 25µM. La sopravvivenza cellulare è stata determinata attraverso il saggio MTT.

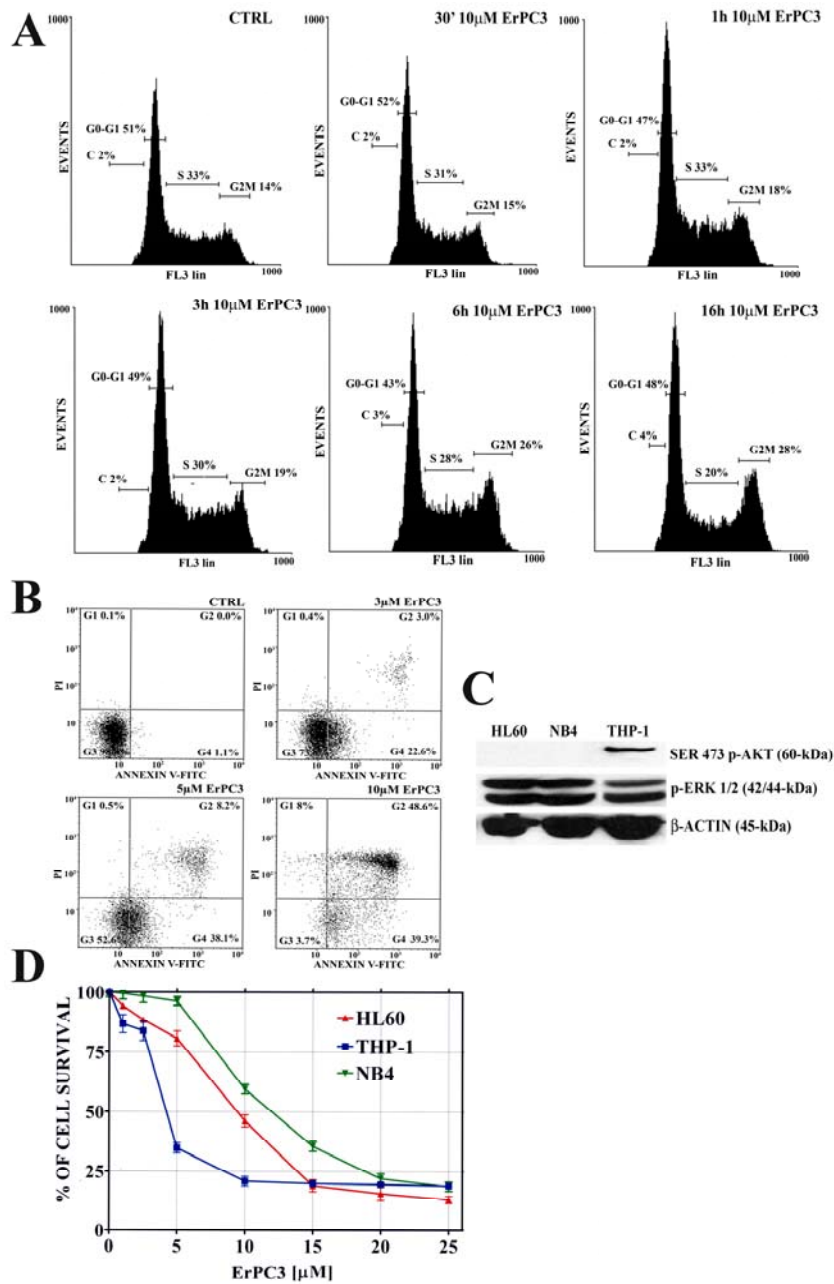


Fig.5.2.1 Il trattamento con ErPC3 induce arresto del ciclo cellulare, apoptosi ed ha un effetto citotossico su linee cellulari di AML. (C) *Western blot analysis* che dimostra i livelli di attivazione basali delle tre linee cellulari: tutte le linee presentano elevati livelli di p-ERK 1/2, mentre solo le cellule THP-1 hanno elevati livelli di espressione di p-Akt sulla Serina 473. L'IC₅₀ del farmaco dopo 24h di trattamento è compreso tra 5 e 13µM.

5.2.2 Il trattamento con ErPC3 modula i *pathways* di trasduzione del segnale di PI3K/Akt e di MEK/Erk nella linea THP-1

Si è voluto, quindi, andare ad indagare i possibili meccanismi molecolari alla base dell'apoptosi indotta da ErPC3 in cellule THP-1.

L'analisi in *immunoblotting* della via della trasduzione del segnale PI3K/Akt, in cellule THP-1 trattate con ErPC3 alle concentrazioni indicate, ha dimostrato che il trattamento induce un aumento dei livelli di espressione delle isoforme α e β della subunità catalitica p110 della PI3K, mentre restano invariati quelli della isoforma δ (Fig.5.2.2(a)). L'ErPC3 causa, inoltre, una diminuzione dei livelli di fosforilazione di Akt su entrambi i residui fosforilabili: ma la diminuzione dei livelli di fosforilazione della Ser473 è meno marcata di quelli della Thr308 e diventa evidente ad una concentrazione di 20 μ M di ErPC3 dopo 24h di trattamento e si accompagna ad una analoga defosforilazione di PDK-1 sulla Ser241. sorprendentemente, il trattamento causa anche una diminuzione dei livelli di espressione della forma totale di Akt che sono evidenti già ad una concentrazione di ErPC3 pari a 10 μ M. Tale diminuzione è probabilmente dovuta ad un taglio proteolitico caspasi dipendente della forma totale di Akt, in quanto il pretrattamento con 10 μ M con l'inibitore della Caspasi-3 previene il decremento della forma totale di Akt dovuta alla somministrazione di ErPC3 alla concentrazione di 10 μ M (Fig. 5.2.2(b)). La stessa analisi in *western blot* condotta sulla via di segnalazione delle MAPK, ha dimostrato una parziale defosforilazione di MEK1 ad una concentrazione di ErPC3 di 5 μ M, mentre

Erk1/2 è già completamente defosforilato ad una concentrazione di 3 μ M ErPC3 dopo 24h di trattamento (Fig. 5.2.2(c e d)). Inoltre se le cellule THP-1 oltre che con ErPC3, sono trattate con 300nM di acido ocaico, un inibitore delle fosfatasi, l'effetto del trattamento con ErPC3 sulla fosforilazione di Erk1/2 viene totalmente annullato, suggerendo che probabilmente l'ErPC3 sia in grado di attivare fosfatasi coinvolte nella defosforilazione di p-Erk 1/2(Fig. 5.2.2(e)).

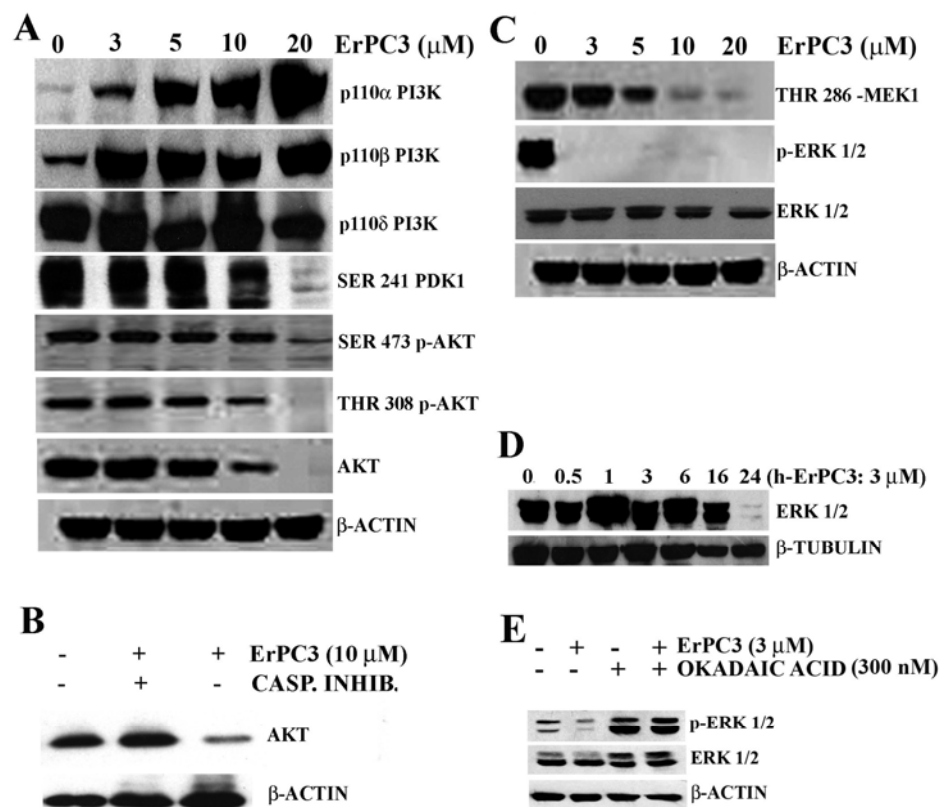


Fig. 5.2.2 ErPC3 influenza le vie trasduzione del segnale di PI3K/Akt e di MEK/Erk 1/2 in cellule THP-1.

5.2.3 L'apoptosi indotta da ErPC3 è in cellule THP-1 caspasi-dipendente

È stata, quindi, condotta un'ulteriore analisi in *immunoblotting* (Fig. 5.2.4(a)), per determinare lo stato di attivazione delle caspasi.

Tale analisi ha evidenziato, dopo 24h di trattamento con ErPC3, una diminuzione dei livelli di espressione delle pro-caspasi -2,-8,-9 e 10 che risultano evidenti rispettivamente alle concentrazioni di 10μM. La diminuzione dei livelli di espressione delle suddette pro-caspasi si accompagna infine ad un'attivazione della caspasi-3 il cui frammento attivo (17KDa), si evidenzia ad una concentrazione di 10μM di ErPC3. Uno studio temporale condotto in *immunoblotting* trattando cellule THP-1 con 10μM di ErPC3 ha evidenziato che l'attivazione delle caspasi avviene precocemente (dopo circa 30' di trattamento) (Fig. 5.2.5).

L'attivazione delle caspasi nel processo apoptotico indotto da ErPC3, così come di una componente apoptotica caspasi indipendente è stata dimostrata in citometria a flusso; l'analisi di campioni colorati con PI e pretrattati con un inibitore *pan*-caspasico (Z-VAD-FMK, 10 μ M per 2h a 37°C), è in grado di ridurre parzialmente l'apoptosi indotta da ErPC3 in cellule THP-1 (Fig. 5.2.4(b)).

A concentrazioni maggiori (20 μ M), il trattamento con ErPC3 è in grado di modulare negativamente l'espressione delle proteine mitocondriali BAX, PUMA e di p-BCL-2 mentre l'espressione di MCL-1 viene incrementata (Fig. 5.2.4(c)).

5.2.4 Il trattamento con ErPC3 determina un'attivazione temporanea e transiente di p-JNK 2/3 in cellule THP-1

Abbiamo voluto, quindi determinare se anche a seguito del trattamento con ErPC3 l'apoptosi indotta fosse dipendente dall'attivazione di JNK.

L'analisi in *immunoblotting* effettuata trattando cellule THP-1 con una concentrazione di ErPC3 di 3 μ M per tempi brevi (30', 1 e 3h), ha evidenziato che il farmaco è in grado di indurre un aumento transiente dei livelli di fosforilazione di p-JNK2/3 dopo 30minuti di trattamento mentre i livelli di espressione di p-JNK1 non subiscono variazioni. L'effettivo coinvolgimento di JNK nell'apoptosi indotta da ErPC3 in cellule THP-1 è stato quindi definitivamente dimostrato attraverso saggi MTT, in cui le cellule sono state trattate con ErPC3 5 μ M in presenza o in assenza di inibitori peptidici di JNK a concentrazioni crescenti (1, 2.5 e 5 μ M).

Come mostrato in Fig.5.2.6, il trattamento con gli inibitori peptidici di JNK è in grado, con un andamento dose-dipendente di ridurre la citotossicità prodotta dal trattamento con ErPC3.

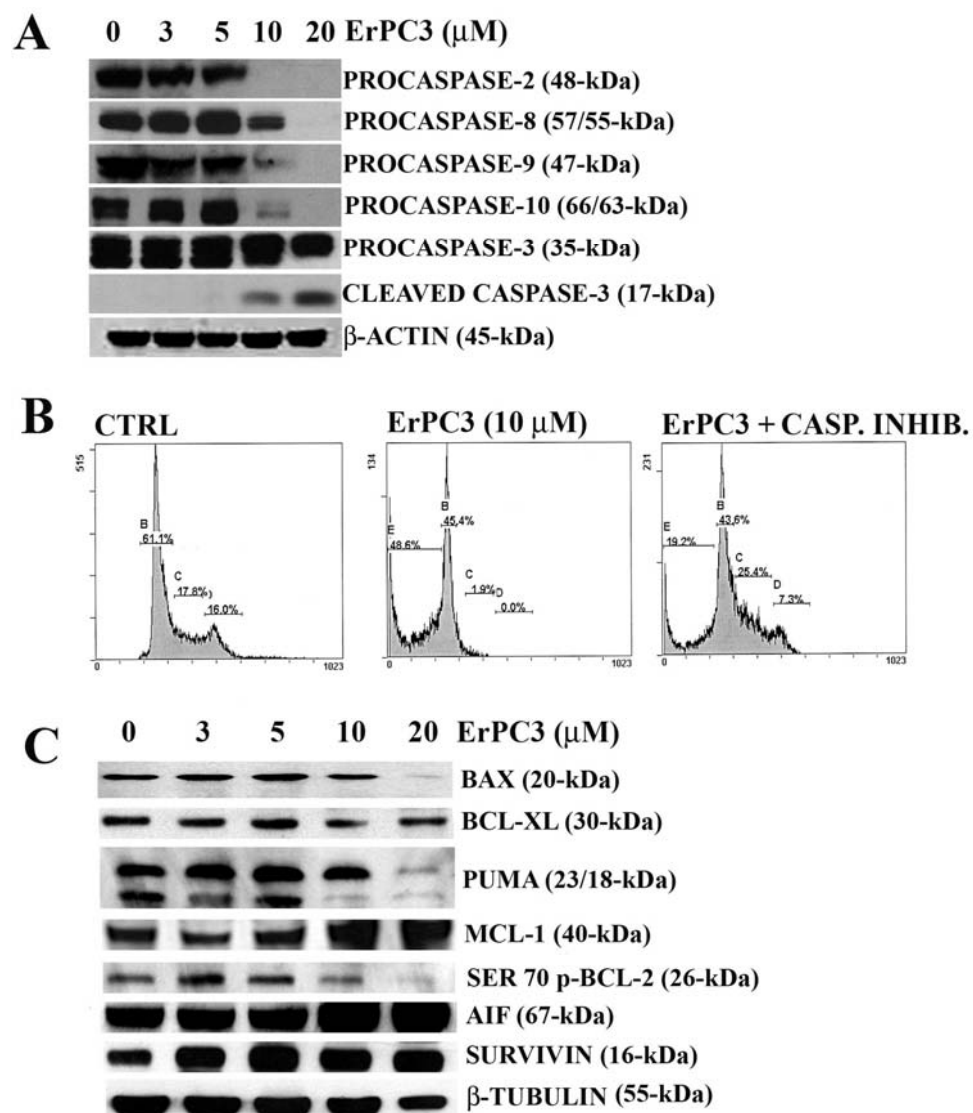


Fig. 5.2.4 L'ErPC3 induce apoptosi caspasi dipendente e modula l'espressione di proteine mitocondriali.

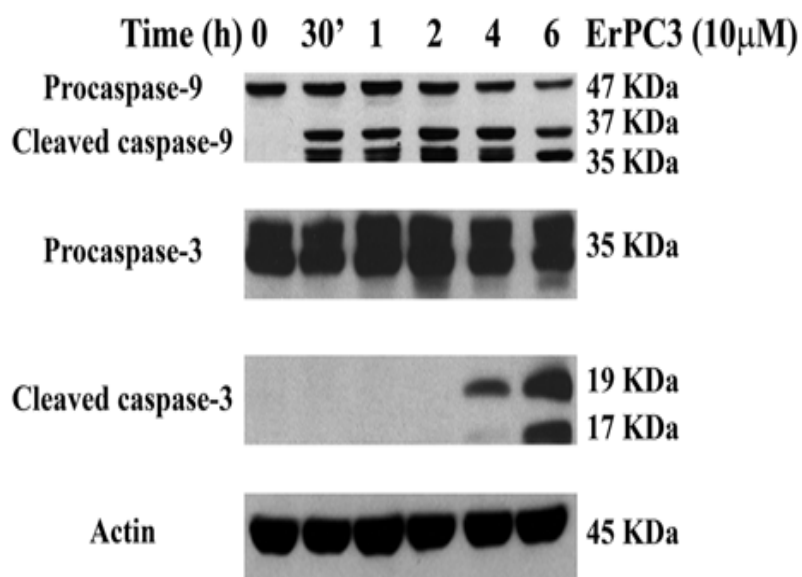


Fig. 5.2.5 Studio cinetico dell'attivazione delle caspasi. Cellule THP-1 sono state trattate con 10mM di ErPC3 per un tempo massimo di 16h. Il western blot dimostra che l'attivazione delle caspasi avviene a tempi precoci di trattamento (30minuti per la Caspasi-9 e 4h per la Caspasi-3).

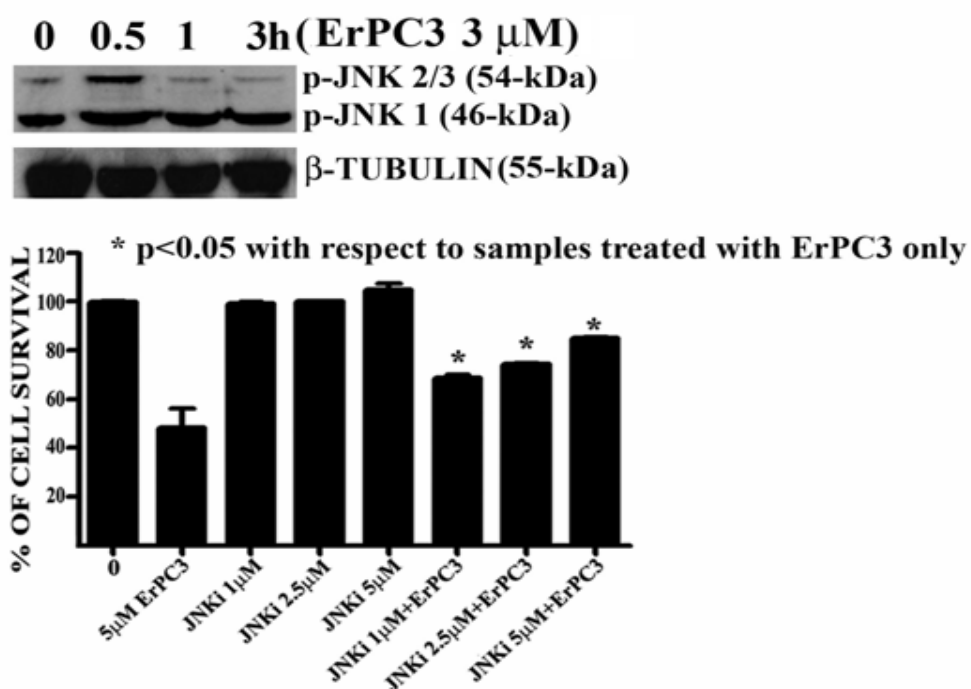


Fig. 5.2.6 Coinvolgimento di JNK nell'apoptosi indotta da ErPC3 in cellule THP-1.

5.2.5 Induzione sinergica di citotossicità attraverso trattamenti combinati di ErPC3 con etoposide, doxorubicina e mitoxantrone

Un potenziale effetto sinergico sulla morte cellulare causata da ErPC3 è stato valutato in studi dose-risposta condotti con altri tre farmaci di vecchia generazione: etoposide, mitoxantrone e doxorubicina.

L'effetto combinato e la sinergia sono stati valutati mediante il metodo della analisi dose-effetto combinata dove i valori di *Combination Index* (CI), sono stati calcolati come descritto in Materiali e Metodi (Tabella 2).

Il CI è considerato positivo (sinergia) quando $CI < 0.85$ e negativo (antagonismo) quando $CI > 1.1$. Valori vicini a 1 sono considerati indicativi di effetto additivo.

Sono stati perciò verificati i livelli di sopravvivenza delle cellule THP-1 anche dopo esposizione a farmaci di vecchia generazione, quando usati da soli: etoposide, mitoxantrone e doxorubicina.

Il saggio MTT evidenzia, inoltre, un IC_{50} fra 1 e 2 μM per un trattamento di 24h con etoposide, fra 5 e 10 nM per un trattamento con mitoxantrone e fra 100 e 200 nM dopo trattamento con doxorubicina.

Poiché la via di trasduzione di PI3K/Akt ha un ruolo fondamentale nella sopravvivenza e nella proliferazione delle linee cellulari di AML; ci è sembrato opportuno, in questo studio, analizzare l'efficacia dell'ErPC3 in combinazione con farmaci chemioterapeutici classici quali: l'etoposide, il mitoxantrone e la doxorubicina. E' stato infatti dimostrato che questi farmaci, interferendo con le vie di trasduzione del segnale, sono capaci di abbassare la soglia dell'apoptosi indotta dai chemioterapici, fornendo in questo modo trattamenti più efficaci nella cura delle neoplasie.

Nella sequenza di somministrazione è stato effettuato un trattamento combinato fra l'ErPC3 e questi antitumorali classici nei due sensi (ErPC3+etoposide; ErPC3→etoposide; etoposide→ErPC3).

Come mostrato in Tabella 2 l'ErPC3 sinergizza con mitoxantrone, etoposide e doxorubicina solo a concentrazioni sub-tossiche di ErPC3; il grado di sinergia è, inoltre strettamente legato al meccanismo di somministrazione.

Infatti, il risultato della combinazione dei farmaci varia a seconda di come sono somministrati: l'ErPC3 mostra un sinergismo con l'etoposide (CI: 0.16), la doxorubicina (CI: 0.48) ed il mitoxantrone (CI 0.33) quando i farmaci sono somministrati insieme.

Al contrario, quando questi sono somministrati preincubandoli da soli, prima del trattamento con ErPC3, si osserva: sinergismo con il mitoxantrone (CI: 0.67) e con l'etoposide (CI: 0.15), mentre la combinazione con la doxorubicina risulta antagonistica (CI: 1.71).

Viceversa, preincubando l'ErPC3 prima dei chemioterapici, si osserva sinergismo con la doxorubicina (CI: 0.79) e l'etoposide (CI: 0.40) ma non con il mitoxantrone (CI: 1.41).

MIXTURE (DRUGS ADMINISTERED TOGETHER)	CI
ErPC3 (87,4nM) - ETOPOSIDE (51,4nM)	0,16
ErPC3 (30nM) - DOXORUBICIN (5nM)	0,48
ErPC3 (20nM) - MITOXANTRONE (3nM)	0,33
MIXTURE (DRUG ADMINISTERED PRIOR TO ErPC3)	
ETOPOSIDE (102,8nM) - ErPC3 (175nM)	0,15
DOXORUBICIN (20nM) - ErPC3 (5nM)	1,71
MITOXANTRONE (20nM)- ErPC3 (3nM)	0,67
MIXTURE (ErPC3 ADMINISTERED PRIOR TO DRUG)	
ErPC3 (87,4nM) - ETOPOSIDE (51,4nM)	0,40
ErPC3 (30nM) - DOXORUBICIN (7,5nM)	0,79
ErPC3 (30nM) - MITOXANTRONE (5nM)	1,41

Tabella 2 Effetto sinergico dell' ErPC3 con farmaci chemioterapici classici in cellule THP-1.

VI DISCUSSIONE

6.1 La perifosina, un nuovo inibitore di Akt, induce arresto del ciclo cellulare, e apoptosi in cellule di leucemia mieloide acuta con un meccanismo JNK dipendente

La perifosina è un alchilfosfolipide, una nuova classe di agenti anti tumorali strutturalmente connessi ai lipidi. Queste molecole hanno tre effetti principali che possono spiegare la loro citotossicità: interferiscono con svariati processi cellulari, tra cui il *turn-over* dei fosfolipidi di membrana e le vie di trasduzione del segnale che si generano da essi; possono indurre segnali di stress ed apoptosi attraverso l'attivazione delle caspasi ed, infine, sono in grado di inibire *pathways* di sopravvivenza cellulare e di proliferazione come quelli della PI3K/Akt e di Erk1/2 [Vink SR, 2007]. In studi clinici di fase I/II sui tumori solidi la perifosina non ha effetti collaterali rilevanti a livello ematologico [Van Ummersen L, 2004; Argiris A, 2006; Leigh NB, 2007].

Poiché entrambi i *pathways* sopra citati svolgono un ruolo importante nella sopravvivenza e nella proliferazione delle leucemie mieloide acute, in questo studio si è voluto, in parte, determinare l'efficacia del trattamento con perifosina da sola o in combinazione con l'etoposide, nel causare un decremento della sopravvivenza di linee cellulari e di blasti di AML. Si è, quindi, dimostrato che la perifosina, con modalità dose-dipendente diminuisce la sopravvivenza di cellule THP-1 e MV4-11. In cellule THP-1, si è osservato una defosforilazione di Akt su entrambi i residui che può essere riscontrata in *western blot* ad una concentrazione di 100nM di perifosina dopo 24h di trattamento. La perifosina non influenza, tuttavia il livello di espressione di PDK-1 né ha effetto sui complessi

in TORC1/mTORC2 o su alcuno dei suoi singoli componenti.

Questi risultati rafforzano, quindi, l'idea che la perifosina sia in grado di defosforilare Akt, impedendo il suo reclutamento alla membrana plasmatica senza interferire con l'attività della PI3K, in accordo con quanto già dimostrato da altri [Kondapaka SB, 2003]. La defosforilazione di Akt a seguito del trattamento con perifosina si traduce in una defosforilazione di uno dei bersagli a valle di Akt/mTORC1, la p-70S6K a concentrazioni maggiori (1μM) la perifosina è, inoltre in grado di indurre la defosforilazione di Erk1/2. Pertanto questo farmaco è in grado di regolare due vie di trasduzione del segnale di importanza fondamentale nella sopravvivenza di cellule di AML [Kornblau SM, 2006; Ricciardi MR, 2005; Lunghi P, 2003]. Tuttavia, il trattamento con perifosina anche a concentrazioni elevate non è in grado, in cellule

THP-1, di defosforilare completamente Erk1/2 anche se la sua chinasi a monte Mek1/2 alle stesse concentrazioni di farmaco è completamente defosforilata.

In cellule THP-1 l'iperattivazione dell'asse PI3K/Akt è dovuta all'over-espressione della p110 δ che causa un aumento dei livelli di PIP3, mentre la ragione dell'attivazione costitutiva di Erk1/2 è sconosciuta [Ruiter GA, 2003; Nyakern M, 2006], mentre in altri tipi cellulari il trattamento con perifosina è in grado di modulare l'espressione di Erk1/2 [Momota H, 2005; Li X, 2006].

Poiché, quindi, la causa dell'attivazione di Erk1/2 in cellule THP-1 non è nota, è difficile spiegare se l'effetto della perifosina su Erk1/2 avvenga in maniera diretta o indiretta. E' stato proposto che l'inibizione di Akt sia in grado di regolare a cascata l'espressione di Raf-1 e di conseguenza anche quella di Erk1/2; è altrettanto noto che PDK-1 sia in grado di fosforilare PAK che a sua volta fosforila Raf-1 attivandolo [McCubrey JA, 2007]. I nostri risultati hanno dimostrato che il trattamento con perifosina non è in grado di alterare lo stato di fosforilazione di PDK-1 o di PAK, rendendo necessarie ulteriori analisi volte al chiarimento dell'effetto della perifosina sulla modulazione del *pathway* di Mek/Erk.

I nostri risultati, hanno dimostrato che la perifosina ha effetto citotossico anche su cellule MV4-11 che presentano mutazioni ITD a livello di FLT3. In questo modello sperimentale, la perifosina è in grado defosforilare Akt senza influenzare lo stato di fosforilazione di FLT3 dimostrando che il trattamento con questo farmaco può essere efficace in pazienti affetti da AML recanti tale mutazione [Advani AS, 2005]. Il trattamento con perifosina in cellule THP-1, comporta l'attivazione di diverse caspasi; in accordo con recenti risultati ottenuti analizzando linee cellulari di mieloma multiplo [Gajate C, 2007], i nostri risultati hanno dimostrato che la prima caspasi apicale ad essere attivata ad una bassa concentrazione di perifosina è la Caspasi-8. In cellule di mieloma multiplo l'attivazione delle caspasi è indipendente da Fas-L, mentre in cellule THP-1, l'effetto citotossico della perifosina risulta almeno parzialmente dipendente dall'attivazione di Fas/Fas-L, in quanto l'utilizzo di anticorpi bloccanti è in grado di aumentare la sopravvivenza di cellule trattate con perifosina revertendone così l'effetto citotossico; sia l'RT-PCR che l'analisi citofluorimetrica hanno dimostrato che la perifosina induce un aumento sia del mRNA di Fas-L che della proteina. L'incremento dei livelli di espressione di Fas-L potrebbe dipendere dal fatto che l'espressione di Fas-L è, almeno in parte, controllata dai fattori trascrizionali FoxO che se fosforilato da Akt, vengono inattivati in quanto escono dal compartimento nucleare e non sono quindi capaci di influenzare positivamente

l'espressione di Fas-L; se l'attivazione di Akt viene, viceversa inibita dalla perifosina, i fattori FoxO non vengono inibiti e possono indurre l'espressione di Fas-L [Nyakern M, 2006; Cappellini A, Tabellini G, 2003].

L'attivazione della caspasi-9, indotta da perifosina può dipendere dal reclutamento di Bid ai *lipid rafts* [Gajate C, 2007]; una volta tagliato per proteolisi dalla Caspasi-9, la forma troncata di Bid migra nel mitocondrio dove consente il rilascio del citocromo C [Gross A., 2006].

Inoltre, i nostri risultati hanno dimostrato per la prima volta l'attivazione della Caspasi-2 a seguito del trattamento con perifosina. Questa attivazione può essere dovuta ad almeno due ragioni: l'attivazione di Fas/Fas-L secondo quanto descritto in letteratura [Droin N, Bichat F, 2001; Wagner KW, 2004] e l'eventuale formazione di ROS (*reactive oxygen species*) a seguito del trattamento con perifosina [Rahmani M, 2005].

I nostri dati, in accordo con quelli di Hideshima e collaboratori, hanno peraltro dimostrato l'attivazione di JNK indotta da perifosina in cellule THP-1.

Inoltre, i nostri studi hanno dimostrato per la prima volta che la perifosina è in grado di indurre apoptosi i blasti di pazienti affetti da AML recanti un'attivazione costitutiva di Akt. Va, inoltre sottolineato, che in questi blasti l'IC50 del farmaco è in un *range* compreso tra 6 e 8mM, dosi che possono essere facilmente somministrate anche *in vivo* senza destare eccessive complicità. D'altronde, però, l'IC50 della perifosina in blasti senza iper-espressione di Akt, è significativamente più alto; in questi casi la diminuzione della sopravvivenza cellulare è probabilmente dovuta alla parziale regolazione di Erk1/2 da parte della perifosina.

La perifosina non è inoltre in grado di influenzare l'attività clonogenica di precursori CD34⁺ provenienti da donatori sani, mentre è in grado di diminuire fortemente quella di cellule CD34⁺ di pazienti AML con un elevato stato di fosforilazione di Akt.

Infine, abbiamo dimostrato che basse concentrazioni di perifosina facilmente raggiungibili nella pratica clinica, sono in grado di aumentare la citotossicità indotta da etoposide.

6.2 L'ErPC3 induce arresto del ciclo cellulare, apoptosi e sinergizza con agenti chemioterapici convenzionali in cellule di leucemia mieloide acuta.

L'erufosina appartiene alla classe delle alchilfosfocoline, una nuova tipologia di agenti antitumorali strutturalmente connessi ad altri lipidi. E' un analogo dei fosfolipidi (alchilfosfocolina) di membrana, ma manca del glicerolo nella sua struttura chimica. E' recentemente entrata nella fase II della sperimentazione clinica per il trattamento di alcuni tumori, in quanto ha dimostrato di avere attività antineoplastica in numerosi tipi di neoplasie, sia *in vivo* (non viene metabolizzata dalle fosfolipasi), che *in vitro* [Erdlenbruch et al 1998].

L'erufosina, così come altri analoghi dei fosfolipidi (perifosina, eldefosina e miltefosina), ha dimostrato di avere effetti pro-apoptotici, in quanto interferisce con il *turn-over* e la sintesi dei fosfolipidi di membrana e blocca la sopravvivenza delle cellule tumorali [Ruiter et al., 2003].

Essa è il primo componente di questa classe che può essere somministrato per via endovenosa in quanto non provoca emolisi [Eibl H. et al., 1995, Erdlenbruch et al. 1999] e ha mostrato recentemente di essere attiva contro tumori umani e linee cellulari leucemiche [Georgieva MC et al., 2002; Jendrossek V et al., 1999].

Nonostante il suo esatto meccanismo di azione debba ancora essere chiarito, a differenza dei chemioterapici classici, che hanno come target il DNA, l'erufosina interagisce attivamente con la membrana plasmatica, a livello dei "lipidi attivi di membrana" (i cosiddetti *lipids rafts*), modulando così segnali intracellulari connessi a molteplici vie di trasduzione del segnale [Langen P et al., 1992, Modolell M et al., 1979, Unger C et al., 1992].

Le alchilfosfocoline hanno tre principali effetti che possono spiegare la loro citotossicità.

Primo, interferiscono con molti processi cellulari inclusi il *turn-over* dei fosfolipidi e le vie di trasduzione del segnale lipide-dipendente; secondo, inducono segnali di stress (attivazione di JNK) e di apoptosi; terzo, inibiscono la sopravvivenza e le vie di proliferazione inclusa quella basata su PI3K/Akt.

Il saggio di attività metabolica (MTT), ha dimostrato come l'erufosina causi una riduzione dell'attività metabolica di tipo dose-dipendente in linee cellulari leucemiche ed induca apoptosi cellulare come dimostrato anche dalla colorazione citofluorimetrica con AnV-FITC e PI.

Per valutare i possibili meccanismi molecolari alla base dell'azione dell' ErPC3 abbiamo condotto analisi in *western blot* dei *pathways* di PI3K/Akt e di MEK/Erk.

Da questo studio emerge che: l'erufosina induce defosforilazione di Akt su entrambi i residui fosforilati a livello della Ser473 e della Thr308 con un andamento dose-dipendente.

Nelle THP-1 si osserva infatti, una defosforilazione di Akt sulla Ser473 e sulla Thr308 che diventa evidente a una concentrazione di erufosina compresa fra 5 e 10 μ M concomitanti ad un decremento dei livelli di fosforilazione di PDK-1 e dell'espressione della forma totale di Akt.

Tale decremento però si accompagna a un aumento dei livelli di espressione di PI3K p110 α e β , mentre restano invariati i livelli di espressione dell'isoforma δ , come già dimostrato in letteratura [Billottet C, et al., 2006]. Ciò potrebbe essere interpretato come un tentativo della cellula di difendersi, aumentando i livelli di espressione di due enzimi che stanno a monte di Akt e che sono coinvolti nella sua attivazione.

L'analisi in *western blot* del *pathway* delle MAPK, ha permesso di evidenziare, inoltre, che l'erufosina riduce i livelli di fosforilazione di MEK in maniera dose-dipendente e così pure quelli di Erk. In particolare, la completa defosforilazione di Erk avviene in maniera maggiore e a tempi più precoci rispetto alla totale defosforilazione di Akt, come dimostrato dal *western blot* effettuato a 24h. Ciò potrebbe indicare che la defosforilazione di Erk non è dovuta solo ad una inibizione di MEK, ma anche ad un'attivazione di fosfatasi da parte dell'erufosina (come dimostrato dall'utilizzo dell'acido ocadaico).

Abbiamo dimostrato quindi che l'erufosina, con un'attività dose-dipendente, riduce la sopravvivenza della linea cellulare THP-1, defosforilando Akt e impedendo il suo legame alla membrana plasmatica senza interferire sull'attività di PI3K.

Allo scopo di indagare i possibili meccanismi molecolari alla base dell'apoptosi indotta da erufosina è stata, inoltre, condotta un'ulteriore analisi in *western blot* per determinare il ruolo svolto dalle caspasi e la loro possibile attivazione.

L'analisi condotta ha dimostrato l'attivazione di queste proteine e di conseguenza anche quella della via di apoptosi da esse mediata.

Nel *western blot*, riportato in Fig. 5.2.4 è, infatti, evidente la riduzione della procaspasi-2, che attiva a sua volta un segnale di apoptosi caspasi-dipendente accompagnata dalla riduzione anche delle pro-caspasi-8 e 9.

Infine si osserva l'attivazione della caspasi-3 effettrice, coinvolta nella degradazione di alcune proteine tra cui PARP, alla concentrazione di 10 μ M, dopo un trattamento di 24h con erufosina.

L'attivazione della chinasi proapoptotica JNK, che modula il bilancio tra i segnali di morte e di sopravvivenza cellulare, avviene, infine, a tempi precoci e ad una concentrazione di 3 μ M di ErPC3. Dall'analisi dei dati sperimentali si osserva che mentre i livelli di fosforilazione di JNK-1 rimangono inalterati, le subunità 2/3 sono attivate dopo circa 1 ora dalla somministrazione di erufosina. L'induzione dell'apoptosi indotta da erufosina in cellule di leucemia mieloide acuta THP-1 sembra avvenire, quindi con modalità caspasi-dipendente ma con un meccanismo JNK-dipendente a dosi più basse. L'inibizione specifica di JNK, infatti, è in grado di ridurre notevolmente l'apoptosi indotta da erufosina. Studi di citofluorimetria, volti a determinare l'effetto del trattamento con ErPC3 in cellule THP-1 sul ciclo cellulare hanno dimostrato, si osserva un arresto in fase G2-M del ciclo cellulare con andamento dose-dipendente che dopo 16 ore di trattamento comporta un aumento dal 14 al 28% della percentuale di cellule bloccate in fase G2-M.

Questo permette di dedurre che l'erufosina, somministrata in cellule THP-1, mostra un'attività antiproliferativa dose-dipendente e un'attività proapoptotica. Una possibile spiegazione dell'aumento dell'apoptosi, osservato in cellule trattate con erufosina, è fornito dai recenti dati che coinvolgono la proteina Akt attivata nella transizione attraverso la fase G2-M del ciclo cellulare [Kandel ES et al., 2002]. Un aumento dell'attività di Akt è stato infatti osservato nelle cellule che entrano in fase G2-M del ciclo cellulare [Shtivelman E et al., 2002]. Akt, infatti, è in grado di inibire le proteine di controllo [Okumura E et al., 2002; Tran H et al., 2002] della transizione in fase G2-M del ciclo cellulare (*checkpoint proteins*). Una possibile spiegazione a questo fenomeno, può essere fornita ipotizzando che l'inattivazione farmacologica di Akt, conseguente all'arresto in fase G2-M, permetta poi la piena attivazione delle vie di riparazione del DNA portando così a morte cellulare per apoptosi [Nyakern et al 2006]. Poiché la via di trasduzione di PI3K/Akt ha un ruolo fondamentale nella sopravvivenza e nella proliferazione delle linee cellulari di AML, in questo studio abbiamo anche voluto indagare l'efficacia dell'erufosina in combinazione con farmaci chemioterapeutici classici quali l'etoposide, il mitoxantrone e la doxorubicina.

E' stato infatti dimostrato che i farmaci che interferiscono con le vie di trasduzione del segnale, sono capaci di abbassare la soglia dell'apoptosi indotta da chemioterapici, fornendo in questo modo trattamenti più efficaci nella cura delle neoplasie [Rosato RR et al., 2002; Rahmani M et al., 2003; Yu C et al., 2003]

Pertanto, abbiamo voluto verificare la possibile interazione sinergica fra l'ErPC3 ed alcuni chemioterapici comunemente usati nella cura delle AML.

La concentrazione di erufosina somministrata è sempre stata mantenuta a livelli sub-tossici e i farmaci sono stati somministrati in rapporto fra loro costante. L'etoposide ha come *target* la Topoisomerasi II e induce apoptosi in cellule THP-1 con un IC50 pari ad una concentrazione di 2µM dopo un trattamento per 24h. Anche il mitoxantrone ha come *target* la Topoisomerasi II, mentre la doxorubicina colpisce preferenzialmente le cellule in fase S [Chen GL, et al., 1984; Sugimoto K et al., 2000; Nyakern M et al., 2006]. Gli altri farmaci antitumorali tradizionali (mitoxantrone e doxorubicina) hanno mostrato un effetto simile sulla sopravvivenza delle cellule THP-1. Il mitoxantrone ha un IC50 di 5nM, mentre la doxorubicina di 200nM. Nella sequenza di somministrazione è stato effettuato un trattamento combinato fra l'erufosina e questi antitumorali classici nei due sensi (erufosina+etoposide; erufosina→etoposide, etoposide→erufosina ad es.). L'erufosina sinergizza con mitoxantrone, etoposide e doxorubicina solo a concentrazioni sub-tossiche di erufosina. Il grado di sinergia è, inoltre, strettamente legato al meccanismo di somministrazione. Infatti, il risultato della combinazione dei farmaci varia a seconda di come sono somministrati: l'erufosina mostra un sinergismo con l'etoposide (CI: 0.16), la doxorubicina (CI: 0.48) ed il mitoxantrone (CI: 0.33) quando i farmaci sono somministrati insieme.

Al contrario, quando questi sono somministrati preincubandoli da soli, prima del trattamento con erufosina, si osserva: sinergismo con il mitoxantrone (CI: 0.67) e con l'etoposide (CI: 0.15), mentre la combinazione con la doxorubicina risulta antagonistica (CI: 1.71).

Viceversa, preincubando l'erufosina prima dei chemioterapici, si osserva sinergismo con la doxorubicina (CI: 0.79) e l'etoposide (CI: 0.40) ma non con il mitoxantrone (CI: 1.41).

E' verosimile che queste differenze siano dovute a cambiamenti nel ciclo cellulare indotti dai vari farmaci somministrati, che si ripercuotono poi sull'efficacia del trattamento.

In conclusione, i nostri esperimenti indicano che la perifosina e l'erufosina, da sole o in combinazione con altri farmaci già esistenti, sono promettenti farmaci per il trattamento di quei casi di AML caratterizzati da una *up-regulation* delle vie di sopravvivenza di PI3K/Akt e/o MEK/ERK anche in assenza di un p53 funzionale.

VII BIBLIOGRAFIA

1. **Franke TF, Yang SI, et al.** "The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase". *Cell* 1995; 81:727-736.
2. **Dudek H, Datta SR, et al.** "Regulation of neuronal survival by the serine threonine protein kinase Akt". *Science* 1997; 275:661-665.
- 3 **Hanada M, Feng J, Hemmings BA.** "Structure, regulation and function of PKB/AKT - a major therapeutic target". *Biochim Biophys Acta* 2004; 1697:3-16.
- 4 **Altomare DA and Testa JR.** "Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer". *Oncogene* 2005; 24:7455-7464.
- 5 **Martelli AM, Tabellini G, et al.** "Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias". *Histol Histopathol* 2005; 20:239-252.
- 6 **Vivanco I and Sawyers CL.** "The posphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer". *Nature Cancer Rev* 2002; 2:489-501.
- 7 **Martelli AM, Nyakern M, et al.** "Phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukaemia". *Leukemia* 2006; 20:911-928.
- 8 **Cully M, You H, et al.** "Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis". *Nature Reviews Cancer* 2006; 6:184-192.
- 9 **Rodriguez-Viciana P, et al.** "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras". *Nature* 1994; 370:527-532.

- 10 **Chan TO, et al.** "Small GTPases and tyrosine kinases coregulate a molecular switch in the phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit". *Cancer Cell* 2002; 1:181-191.
- 11 **Franke TF, Hornik CP, et al.** "PI3K/Akt and apoptosis: size matters". *Oncogene* 2003; 22:8983-8998.
- 12 **Brazil DP, Yang ZZ and Hemmings BA.** "Advances in protein kinase B signalling: AKT ion on multiple fronts". *Trends Biochem Sci* 2004; 29:233-242.
- 13 **Du K and Tsichlis PN.** "Regulation of the Akt kinase by interacting Proteins". *Oncogene* 2005; 24:7401-7409.
- 14 **West KA, Castillo SS and Dennis PA.** "Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance". *Drug Resist Updat* 2002; 5:234-248.
- 15 **Maehama T and Dixon JE.** "The tumor suppressor PTEN/MMAC1 dephosphorylates the lipid second messenger phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate". *J Biol Chem* 1998; 273:13375-13378.
- 16 **Stambolic V, et al.** "Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN". *Cell* 1998; 95:29-39.
- 17 **Choi Y, Zhang J, et al.** "PTEN, but not SHIP1 and SHIP2, suppresses the PI3K/Akt pathway and induces growth inhibition and apoptosis of myeloma cells". *Oncogene* 2002; 21:5289-5300.
- 18 **Borgatti P, Martelli AM, et al.** "Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin". *J Cell Physiol* 2003; 196:79-88.
- 19 **Liu W, Akhand AA, et al.** "Protein phosphatase 2A-linked and -unlinked caspase-dependent pathways for downregulation of Akt kinase triggered by 4-hydroxynonenal". *Cell Death Differ* 2003; 10:772-781.

20 **Gao T, Furnari F and Newton AC.** "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth". *Mol Cell* 2005; 18:13-24.

21 **Thompson JE and Thompson CB.** Putting the rap on Akt. *J Clin Oncol* 2004; 22:4217-4226.

22 **Zhao S, Konopleva M, Cabreira-Hansen M et al.** "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemias". *Leukemia* 2004; 18:267-75.

23 **Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M, Downward J.** "Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis". *Mol Cell* 2003;11:11-23.

24 **Aggarwal BB.** "Nuclear factor-kB: the enemy within". *Cancer Cell* 2004; 6: 203-208.

25 **Shishodia S and Aggarwal BB.** "Nuclear factor-kappa B activation: a question of life or death". *J Biochem Mol Biol* 2002; 35:28-40.

26 **Bortul R, Tazzari PL, Cappellini A et al.** "Constitutively active Akt1 protects HL60 leukemia cells from TRAIL-induced apoptosis through a mechanism involving NF-kappaB activation and cFLIP(L) up-regulation". *Leukemia* 2003; 17:379-89.

27 **Tabellini G, Cappellini A, Tazzari PL et al.** "Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells". *J Cell Physiol* 2005; 202:623-34.

28 **Grandage VL, Gale RE, et al.** "PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kB, Mapkinase and p53 pathways". *Leukemia* 2005; 19:586-594.

- 29 **Birkenkamp KU, Geugien M, et al.** "Constitutive NF- κ B DNA-binding activity in AML is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway". *Leukemia* 2004; 18:103-112.
- 30 **Arden KC and Biggs III WH.** "Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signalling". *Arch Biochem Biophys* 2002; 403:292-298.
- 31 **Van Der Heide LP, Hoekman MF and Smidt MP.** "The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation". *Biochem J* 2004; 380:297-309.
- 32 **Sherr CJ, Roberts JM.** "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression". *Genes Dev* 1999; 13:1501-12.
- 33 **Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM.** "AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1". *Nature* 2000; 404:782-7.
- 34 **Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massagué J.** "Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation". *Cell* 2004; 117:211-23.
- 35 **Kops GJ, Medema RH, Glassford J et al.** "Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors". *Mol Cell Biol* 2002; 22:2025-36.
- 35 **Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR.** "A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR". *Cancer Cell* 2002; 2:81-91.
- 36 **Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A et al.** "Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D". *Mol Cell Biol* 2002; 22:7842-52.

37 **Li Y, Corradetti MN, et al.** "TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway". *Trends Biochem Sci* 2004; 29:32-38.

38 **Hay N and Sonenberg N.** "Upstream and downstream of mTOR". *Genes Dev* 2004; 18:1926-1945.

39 **Kim DH, et al.** "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery". *Cell* 2002; 110:163-175.

40 **Kim DH, et al.** "GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive interaction between raptor and mTOR". *Mol Cell* 2003; 11:895-904.

41 **Fingar DC, Salama S, et al.** "Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E". *Genes Dev* 2002;16:1472-1487.

42 **Jacinto E, et al.** "Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive". *Nature Cell Biol* 2004; 6:1122-1128.

43 **Sarbassov DD, Guertin DA, et al.** "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex". *Science* 2005; 307:1098-1101.

44 **Hardt SE, Sadoshima J.** "Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development". *Circ Res.* 2002; 90:1055-63.

45 **Bennett RL, Blalock WL, et al.** "RAX, the PKR activator, sensitizes cells to inflammatory cytokines, serum withdrawal, chemotherapy and viral infection". *Blood* 2006; 108:821-829.

46 **Platanias, L. C.** "Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies." *Blood* 2003; 101(12): 4667-79.

47 **McCubrey, J. A., L. S. Steelman, et al.** "Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance." *Adv Enzyme Regul* 2006; 46: 249-79.

48 **Brozovic, A., G. Fritz, et al...** "Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance." *Int J Cancer* 2004; 112(6): 974-85.

49 **Li, X., R. Luwor, et al...** "Enhancement of antitumor activity of the anti-EGF receptor monoclonal antibody cetuximab/C225 by perifosine in PTEN-deficient cancer cells." *Oncogene* 2006; 25(4): 525-35.

50 **Kubota Y, Ohnishi H, et al..** "Constitutive activation of PI3K is involved in the spontaneous proliferation of primary acute myeloid leukemia cells: direct evidence of PI3K activation". *Leukemia* 2004; 18:1438-1440.

51 **Xu Q, Simpson SE, et al..** "Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation". *Blood* 2003; 102:972-980.

52 **Tazzari PL, Cappellini A, et al..** "Detection of serine 473 phosphorylated Akt in acute myeloid leukemias blasts by flow cytometry". *Br J Haematol* 2004; 126:675-681.

53 **Steelman LS, Pohnert SC, et al..** "JAK/STAT, RAF/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004; 18:189-218.

54 **Minami Y, Yamamoto K, et al..** "Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukaemia". *Blood* 2003; 102:2969-2975.

55 **Naoe T, Kiyoi H.** "Normal and oncogenic FLT3". *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:2932-8.

56 **Cornillet-Lefebvre P, Cuccuini W, et al...** "Constitutive phosphoinositide 3-kinase activation in acute leukemia is not due to p110 δ mutations". *Leukemia* 2006; 20:374-376.

57 **Vazquez F, Grossman SR, et al.** "Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex".

J Biol Chem 2001; 276:48627-48630.

58 **Daher A, Longuet M, et al.** "Two dimerization domains in the transactivation response RNA-binding protein (TRBP) individually reverse the protein kinase R inhibition of the HIV-1 long terminal repeat expression".

J Biol Chem 2001; 276:33899-33905.

59 **Gutiérrez NC, López-Pérez R, Hernández JM et al.** "Gene expression profile reveals deregulation of genes with relevant functions in the different subclasses of acute myeloid leukemia". *Leukemia* 2005;19:402-9.

60 **O’Gorman DM, McKenna SL, McGahon AJ, Knox KA, Cotter TG.** "Sensitization of HL-60 human leukemic cells cytotoxic drug induced apoptosis by inhibition of PI3-K survival signals". *Leukemia* 2000; 14 (4): 602-11.

61 **Martelli, A. M., M. Nyåker, et al.** "Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia." *Leukemia* 2006; 20(6): 911-28.

62 **Kumar CC, Madison V.** "AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors". *Oncogene* 2005; 24:7493-501.

63 **Kondapaka, S. B., S. S. Singh, et al.** "Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation". *Mol Cancer Ther* . 2003; 2(11): 1093-103.

64 **Ruiter, G. A., S. F. Zerp, et al.** "Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway". *Anticancer Drugs* 2003; 14: 167-73.

65 **Vink, S. R., J. H. Schellens, et al..** "Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid".

Invest New Drugs 2005; 23: 279-86.

66 **Nyakern M, Cappellini A, Mantovani I, Martelli AM.** "Synergistic induction of apoptosis in human leukemia T cells by the Akt inhibitor perifosine and etoposide through activation of intrinsic and Fas-mediated extrinsic cell death pathways". *Mol Cancer Ther* 2006; 5:1559–1570.

67 **Ruiter, G. A., S. F. Zerp, et al...** "Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis".

Cancer Res 1999; 59:2457-63.

68 **Patel, V., T. Lahusen, et al....** "Perifosine, a novel alkylphospholipid, induces p21(WAF1) expression in squamous carcinoma cells through a p53-independent pathway, leading to loss in cyclin-dependent kinase activity and cell cycle arrest". *Cancer Res* 2002; 62:1401-9.

69 **Hideshima, T., L. Catley, et al...** "Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells." *Blood* 2006; 107:4053-62.

70 **Hideshima, T., J. E. Bradner, et al...** "Intracellular protein degradation and its therapeutic implications." *Clin Cancer Res* 2005; 11:8530-3.

71 **Gajate, C. and F. Mollinedo.** "Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts." *Blood* 2007; 109:711-9.

72 de Vries, J. F., L. J. Wammes, et al... "Involvement of caspase-8 in chemotherapy-induced apoptosis of patient derived leukemia cell lines independent of the death receptor pathway and downstream from mitochondria."

Apoptosis 2007; 12:181-93.

73 Hilgard, P., J. Pohl, et al... "The development of alkylphosphocholines as signal transduction inhibitors: experimental and clinical challenges."

J Cancer Res Clin Oncol 1997; 123: 286-7.

74 Van Ummersen, L., K. Binger, et al... "A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer." *Clin Cancer Res* 2004; 10:7450-6.

75 Kukreja, A., A. Hutchinson, et al... "Bortezomib disrupts tumour-dendritic cell interactions in myeloma and lymphoma: therapeutic implications."

Br J Haematol 2007; 136(1): 106-10.

75 Rahmani, M., E. Reese, et al... "Cotreatment with suberanoylanilide hydroxamic acid and 17-allylamino 17-demethoxygeldanamycin synergistically induces apoptosis in Bcr-Abl+ Cells sensitive and resistant to STI571 (imatinib mesylate) in association with down-regulation of Bcr-Abl, abrogation of signal transducer and activator of transcription 5 activity, and Bax conformational change." *Mol Pharmacol* 2005; 67:1166-76.

76 Dasmahapatra, G. P., P. Didolkar, et al... "In vitro combination treatment with perifosine and UCN-01 demonstrates synergism against prostate (PC-3) and lung (A549) epithelial adenocarcinoma cell lines." *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5242-52.

77 **Crul, M., H. Rosing, et al...** "Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours." *Eur J Cancer* 2002; 38: 1615-21.

78 **Ernst, D. S., E. Eisenhauer, et al...** "Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma".

Invest New Drugs 2005; 23:569-75.

79 **Knowling, M., M. Blackstein, et al...** "A phase II study of perifosine (D-21226) in patients with previously untreated metastatic or locally advanced soft tissue sarcoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial." *Invest New Drugs* 2006; 24: 435-9.

80 **Hilgard, P., J. Pohl, et al...** "The development of alkylphosphocholines as signal transduction inhibitors: experimental and clinical challenge".

J Cancer Res Clin Oncol 1997; 123: 286-7.

81 **Diomede L, Colotta F, Piovani B et al..** "Induction of apoptosis in human leukemic cells by the ether lipid 1-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. A possible basis for its selective action".

Int J Cancer 1993; 53:124-30.

82 **Mollinedo F., Fernandez-Luna JL., et al...** " Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L)".

Cancer Res 1997; 57: 1320.

83 **Erdlenbruch B., Jendrossek V. et al...** " Antitumor effects of erucylphosphocholine on brain tumor cells in vitro and in vivo".

Anticancer Res 1998; 18:2551-7.

84 **Berkovic D., Bensch M. et al..** “ Effects of hexadecylphosphocholine on thrombocytopoiesis”. *Eur J Cancer* 2001; 37:503.

85 **Konstantinov SM., Eibl H. et al..** “ Alkylphosphocolines induces apoptosis in HL-60 and U937 leukemic cell lines”.

Cancer Chemother Pharmacol 1998; 41:210.

86 **Kotting J, Berger MR, et al..** “ Alkylphosphocolines: influence of structural variation on biodistribution and antineoplastically active concentrations”.

Cancer Chemother Pharmacol 1992; 30:105.

87 **Eibl H., Kaufmann-Kolle P. et al..** “ Medical application of synthetic phospholipids as liposomes and drugs”. *J Liposome Res* 1995; 5:131.

88 **Erdlenbruch B., Jendrossek V. et al..** “ Erucylphosphocoline: pharmacokinetics, biodistribution, CNS accumulation and toxicity in the rat after intravenous application”. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44:484-90.

89 **Berger MR, Sobottka S. et al..** “ Erucylphosphocholine is the prototype of i.v. injectable alkylphosphocolines “. *Drugs Today* 1998; 34: 73-81.

90 **Chou, T. C. and P. Talalay.** "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors."

Adv Enzyme Regul 1984; 22: 27-55.

91 **Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ, et al..** Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML”.*Blood* 2007;109:3509-12.

- 92 **Das H, Koizumi T, Sugimoto T, Chakraborty S, et al.** “Quantitation of Fas and Fas ligand gene expression in human ovarian, cervical and endometrial carcinomas using real-time quantitative RT-PCR”. *Br J Cancer* 2000; 82:1682–1688.
- 93 **Casamayor A, Morrice NA, Alessi DR.** “Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo”. *Biochem J* 1999; 342:287–292.
- 94 **Recher C, Dos Santos C, Demur C, Payrastre B.** “mTOR, a new therapeutic target in acute myeloid leukemia”. *Cell Cycle* 2005; 4:1540–1549.
- 95 **Tazzari PL, Cappellini A, Ricci F, et al.** “Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts”. *Leukemia* 2007; 21:427–438.
- 96 **Lee SY, Cherla RP, Tesh VL.** “Simultaneous induction of apoptotic and survival signaling pathways in macrophage-like THP-1 cells by Shiga toxin 1”. *Infect Immun* 2007; 75:1291–1302.
- 97 **Kappelmayer J, Udvardy M, Antal-Szalmas P.** “Pgp and FLT3: identification and modulation of two proteins that lead to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia”. *Curr Med Chem* 2007; 14:519–530.
- 98 **Yee KW, O’Farrell AM, Smolich BD, et al.** “SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase”. *Blood* 2002; 100:2941–2949.
- 99 **Vink SR, van Blitterswijk WJ, Schellens JH, Verheij M.** “Rationale and clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy”. *Cancer Treat Rev* 2007; 33:191–202.
- 100 **Argiris A, Cohen E, Karrison T, R et al.** “A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer”.

Cancer Biol Ther 2006; 5:766–770.

101 **Leighl NB, Dent S, Clemons M, et al..** “A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer”. *Breast Cancer Res Treat* 2007

102 **Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, et al..** “Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2006; 108:2358–2365.

103 **Ricciardi MR, McQueen T, Chism D, et al..** “Quantitative single cell determination of ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukaemia”. *Leukemia* 2005; 19:1543–1549.

104 **Lunghi P, Tabilio A, Dall’Aglio PP, et al..** “Downmodulation of ERK activity inhibits the proliferation and induces the apoptosis of primary acute myelogenous leukaemia blasts”. *Leukemia* 2003; 17:1783–1793.

105 **Momota H, Nerio E, Holland EC.** “Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo”. *Cancer Res* 2005; 65:7429–7435.

106 **McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al..** “Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance”. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773:1263–1284.

107 **Advani AS.** “FLT3 and acute myelogenous leukemia: biology, clinical significance and therapeutic applications”. *Curr Pharm Des* 2005; 11:3449–3457.

108 **Cappellini A, Tabellini G, Zweyer M, et al..** “The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway regulates cell cycle progression of HL60 human leukemia cells through cytoplasmic relocation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) and control of cyclin D1 expression”. *Leukemia* 2003; 17:2157–2167.

109 **Gross A.** “BID as a double agent in cell life and death”. *Cell Cycle* 2006; 5:582–584.

110 **Droin N, Bichat F, Rebe C, et al.** "Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-mediated cell death of human leukemic cells. *Blood* 2001; 97:1835–1844.

111 **Wagner KW, Engels IH, Deveraux QL.** "Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway". *J Biol Chem* 2004; 279: 35047–35052.

112 **Georgieva MC, Konstantinov SM, Topashka-Ancheva M, Berger MR.** "Combination effects of alkylphosphocholines and gemcitabine in malignant and normal hematopoietic cells". *Cancer Lett* 2002 ;182:163-74.

113 **Jendrossek V, Erdlenbruch B, Hunold A, et al.** " Erucylphosphocoline , a novel antineoplastic ether lipid, blocks growth and induces apoptosis in brain tumor cell lines in vitro". *Int J Oncol* 1999; 14:15-22.

114 **Langen P, Maurer HR, Brachwitz H, et al.** "Cytostatic effects of various alkyl phospholipid analogues on different cells in vitro". *Anticancer Res* 1992; 12: 2109-2112.

115 **Modolell M, Andreessen R, Pahlke W, et al.** "Disturbance of phospholipid metabolism during the selective destruction of tumor cells induced by alkyllysophospholipids". *Cancer Res* 1979; 39:4681-4686.

116 **Unger C, Fleer EA, Kotting J, et al.** "Antitumoral activity of alkylphosphocolines and analogues in human leukemia cell lines". *Prog Exp Tumor Res* 1992; 34:25-32.

117 **Billottet C, Grandage VL, Gale RE, et al.** "A selective inhibitor of the p110d isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16". *Oncogene* 2006; 25:6648-6659.

118 **Shtivelman E, Sussman J, Stokoe D.** "A role for PI3-kinase and PKB activity in the G₂/M phase of the cell cycle". *Curr Biol* 2002; 12:919-24.

119 **Okumura E, Fukuhara T, Yoshida H et al.** "Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G₂/M-phase transition".

Nat Cell Biol 2002; 4:111-6.

120 **Tran H, Brunet A, Grenier JM, et al.** "DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein".

Science 2002; 296:530-4.

121 **Rosato RR, Almenara JA, Cartee L, et al.** "The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol disrupts sodium butyrate-induced p21 WAF1/CIP1 expression and maturation while reciprocally potentiating apoptosis in human leukemia cells". *Mol Cancer Ther* 2002; 1:253-66.

122 **Yu C, Rahmani M, Conrad D, et al.** "The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl⁺ cells sensitive and resistant to STI571". *Blood* 2003; 102:3765-74.

123 **Chen GL, Yang L, Rowe TC, et al.** "Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II".

J Biol Chem 1984; 259:13560-6.

124 **Sugimoto K, Tamayose K, Takagi M, et al.** "Activation of an ataxia telangiectasia mutation-dependent intra-S-phase checkpoint by antitumor drugs in HL-60 and human lymphoblastoid cells". *Br J Haematol* 2000; 110:819-5.

125 **Steelman LS, Pohnert SC, et al.** "JAK/STAT, RAF/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis".

Leukemia 2004; 18:189-218.

126 **Vazquez F, Grossman SR,et al.** "Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex".

J Biol Chem 2001; 276:48627-48630.